

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO COMO
INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A
CÉLULAS DENDRÍTICAS**

POR

Q.B.P. EDGAR LÓPEZ PACHECO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

FEBRERO, 2016

**POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO COMO INDUCTOR DE
DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A CELULAS DENDRÍTICAS.**

Comité de tesis

Director de Tesis

Dr. Moisés A. Franco Molina

Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal 1

Dra. Diana G. Zárate Triviño

Vocal 2

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal 3

Dr. Pablo Zapata Benavides

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Moisés A. Franco Molina.

Índice general

Sección	Página
Agradecimientos	1
Dedicatoria	2
Lista de tablas.....	3
Lista de figuras.....	4
Nomenclatura	5
1. Resumen.....	9
2. Abstract	10
3. Introducción	11
4. Antecedentes	10
4.1. Introducción: células dendríticas	12
4.1.1 Biología de las células dendríticas.....	12
4.1.2 Células dendríticas y su papel en la inmunoterapia celular	21
4.2. Generación de células dendríticas humanas	24
4.2.1. Diferenciación de células dendríticas con estímulos exógenos y endógenos	24
4.2.2. Limitaciones de los protocolos actuales de generación de células dendríticas.....	27
4.3. Biomateriales como agentes inductores de diferenciación celular	29
4.3.1. Estudios de diferenciación celular con biomateriales	29
4.3.2. Limitaciones de los biomateriales durante el cultivo de células.....	31
4.4. Nanopartículas de quitosano como inductor de diferenciación	32
4.4.1. Producción de quitosano y sus propiedades físico-químicas.....	32
4.4.2. Nanotecnología y aplicaciones actuales de las nanopartículas	36
4.4.3. Biología de las nanopartículas y su interacción con células	37
4.4.4. Propiedades que influyen el comportamiento de nanopartículas.....	40
4.4.5. Síntesis de nanopartículas de quitosano: gelación iónica	43
5. Hipótesis	45
6. Objetivos	45
6.1. Objetivo general	45

6.2. Objetivos específicos.....	45
7. Material y métodos	46
7.1. Síntesis de nanopartículas de quitosano	46
7.2. Caracterización de nanopartículas de quitosano.....	46
7.2.1. Tamaño promedio de nanopartícula	46
7.2.2. Carga superficial de nanopartícula: potencial z.....	46
7.2.3. Microscopía electrónica de barrido	47
7.2.4. Espectroscopia de infrarrojo	47
7.3. Detección de endotoxina bacteriana presente en nanopartículas	47
7.4. Establecimiento del cultivo primario de monocitos de sangre periférica	48
7.5. Grupos experimentales	49
7.6. Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas	49
7.7. Evaluación morfológica de monocitos tratados con nanopartículas	49
7.8. Viabilidad celular de monocitos tratados con nanopartículas.....	50
7.9. Capacidad fagocítica de monocitos tratados con nanopartículas.....	50
7.10. Análisis estadísticos	50
8. Resultados	51
8.1. Tamaño promedio de nanopartícula mediante dispersión de luz dinámica	51
8.2. Análisis de carga superficial de nanopartícula de quitosano (potencial z).....	51
8.3. Morfología de nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido	52
8.4. Análisis de formación de partícula mediante espectroscopia de infrarrojo.....	52
8.5. Concentración de endotoxina bacteriana presente en nanopartículas	54
8.6. Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano	55
8.7. Viabilidad celular y morfología de monocitos humanos tratados con nanopartículas.....	57
8.8. Capacidad fagocítica de monocitos humanos tratados con nanopartículas.....	58
9. Discusión.....	59
10. Conclusiones	64
11. Perspectivas.....	65
12. Literatura consultada	66
13. Resumen biográfico.....	77

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas: Dr. Moisés A. Franco Molina, Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dra. Diana G. Zarate Triviño, Dr. Edgar Mendoza Gamboa y el Dr. Pablo Zapata Benavides por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosos comentarios, sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

A la unidad de Inmunoterapia del laboratorio de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por permitirme el uso de su equipo, material y su invaluable ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A dios por siempre ayudarme a seguir a delante en los momentos que más lo necesitaba, a mi familia por el apoyo que me brinda a diario y que no siempre les agradezco como debería, así como a mis amigos, compañeros y maestros que contribuyeron de una u otra forma en la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A Dios:

Por ser aquel amigo que siempre está presente en los buenos y malos momentos y por permitirme tener una familia, amigos y una vida tan hermosa.

A mis padres:

Jesús López Urdiales y María del Refugio Pacheco Mendoza, por siempre haberme mostrado su incondicional apoyo hacia mí, y por siempre haberme soportado en aquellos momentos en los que me sentía estresado, molesto o deprimido. Gracias los amo mucho.

A mi novia:

Gracias por siempre hacerme sentir especial a tu lado eres lo más valioso en mi vida y te dedico este trabajo con todo mi corazón. Te amo mucho Sarahi Sánchez Ríos.

A mis hermanos:

Melissa, Jesús y Diana, por los buenos momentos en los que bromeamos, jugamos juntos y disfrutamos estar el uno con el otro y que de alguna manera hacen olvidar los pequeños problemas que nosotros mismos hacemos grandes. Gracias los quiero mucho.

A mis amigos:

A Ivonne, Erika, Carmen, Lily, Yarellis, Alex, Fernanda, Violeta, Rilque, Sarita, Cristel, Fabiola, Daniela, Baldomero, Gustavo, Martín, Víctor, Juanjo, Claudia, Mayra, Megan, Marta Thalia, Raúl, Sonia, Mario y Lolita por siempre estar ahí cuando uno los necesitaba y por siempre haberme apoyado al 100% en todo. Gracias.

Índice de tablas

TABLA	Página
1. Eventos adversos reportados durante la terapia con sipuleucel-T	24
2. Principales citocinas recombinantes utilizadas en el proceso de diferenciación de células dendríticas y sus costos en el mercado	28
3. Precios actuales en el mercado de distintas presentaciones de quitosano.....	35

Índice de figuras

Figura.....	Página
1. Vías de procesamiento y presentación de antígeno	16
2. Moléculas de superficie celular involucradas en la sinapsis inmunológica	18
3. Diferenciación de linfocitos T vírgenes a células Th1 y Th2	19
4. Proceso de manufactura de Sipuleucel-T (PROVENGE®).....	22
5. Mecanismo de acción de Sipuleucel-T (PROVENGE®)	23
6. Diferenciación de células dendríticas con estímulos exógenos y endógenos	26
7. Reacción de desacetilación termoalcalina de la quitina.....	33
8. Estructura química de la celulosa (A), quitina (B) y quitosano (C).....	34
9. Aplicaciones de las nanopartículas en el área de la salud	36
10. Mecanismos celulares de incorporación de nanopartículas por las células.....	38
11. Parámetros físico-químicos determinantes entre la interacción de nanopartículas con células	41
12. Gelación iónica. A) tripolifosfato pentasodico, B) quitosano, C) nanopartículas de quitosano	43
13. Análisis de tamaño promedio de partícula mediante dispersión de luz dinámica.....	51
14. Análisis de potencial z de partícula mediante electroforesis doppler con láser	51
15. Análisis morfológico de nanopartículas por microscopia electrónica de barrido	52
16. Grupos funcionales de nanopartículas mediante espectroscopia de infrarrojo	53
17. Detección de endotoxina bacteriana presente en muestras de nanopartículas	54
18. Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano	55
19. Histogramas de citometría de flujo representativos del análisis fenotípico celular	56
20. Viabilidad celular y morfología de monocitos tratados con nanopartículas	57
21. Capacidad fagocítica de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.....	58

Nomenclatura

%	Porcentaje
°	Grados
°C	Grados centígrados
μM	Micromolar
μm	Micrómetros
20X	Objetivo 20X
60X	Objetivo 60X
Ag	Antígeno
ANOVA	Análisis de varianza
CPA	Célula presentadora de antígeno
ATP	Adenosín trifosfato
B7-DC	Molécula coestimuladora B7-DC
B7-H1	Molécula coestimuladora B7-H1
BALB/c	Ratón de laboratorio cepa BALB/c
C ₃ -O	Carbono número 3-oxígeno
C57BL/6	Ratón de laboratorio cepa C57BL/6
C ₆ -O	Carbono número 6-oxígeno
CCR	Receptor de quimiocinas
CD ⁻	Cluster de diferenciación ausente
CD ⁺	Cluster de diferenciación presente
CD	Cluster de diferenciación
CD14 ^{mod}	Cluster de diferenciación 14 moderado
CD40L	Ligando del cluster de diferenciación 40
Células NK	Células natural killer

C-H	Carbono-hidrógeno
CIMAV	Centro de investigación en materiales avanzados
CINVESTAV	Centro de investigación y de Estudios Avanzados del IPN
CLIP	Péptido de la cadena invariante asociado a clase II
cm ⁻¹	Centímetros ⁻¹
CO ₂	Dióxido de carbono
COOH	Grupo funcional carboxilo
CpG	Islotes CpG
CTLA-4	Antígeno 4 ligado a linfocitos T citotóxicos
DD	Grado de desacetilación
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FDA	Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
g	Gramos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HCl	Ácido clorhídrico
HLA	Antígeno leucocitario humano
HMW	Peso molecular alto
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
ICOS	Coestimulador inducible
IFN- γ	Interferón gamma

I _i	Cadena I _i
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KLH	Hemocianina de la lapa californiana (<i>Megathura crenulata</i>)
LAL	Lisado de amebocitos de <i>Limulus polyphemus</i>
LcK	Tirosina quinasa específica de leucocitos
LFA-1	Antígeno 1 asociado a función leucocitaria
LMW	Peso molecular bajo
LPS	Lipopolisacárido
MDC	Quimiocina derivada de macrófagos
mg/mL	Miligramos/mililitro
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-3	Quimiocinas CCL19
MMW	Peso molecular intermedio
mV	Milivolts
MW	Peso molecular
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-κB	Factor nuclear κB
NH ₂	Grupo funcional amino
NKT	Linfocitos T natural killer
Nm	Nanometros
Nps	Nanopartículas
OH	Grupo funcional hidroxilo
p<0.05	Significancia estadística menor a 0.05

PAP-GM-CSF	Fosfatasa ácida prostática fusionada con GM-CSF
PARC	Quimiocina reguladora de activación pulmonar
PBS 1X	Buffer de fosfatos salinos concentración 1X
PDI	Índice de polidispersidad
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial de iones hidrógeno
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
P-O	Fosfato-oxígeno
RANTES	Regulado sobre activación en células T activadas expresado y secretado
RE	Retículoendoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Medio de cultivo RPMI formula 1640
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFB	Suero Fetal Bovino
SMAC	Complejo activador central supramolecular
TAP	Proteína transportadora asociada con el procesamiento de antígenos
TARC	Quimiocina regulada y activada del timo
TGF- β	Factor transformante β
Th1	Células T cooperadoras 1
Th2	Células T cooperadoras 2
TPP	Tripolifosfato pentasódico
UE/mL	Unidades de endotoxina/mililitro
UV	Ultravioleta

1. Resumen

Las células dendríticas son presentadores de antígenos conocidos como centinelas inmunológicos. Su capacidad para procesar y presentar antígenos son las bases de la inmunoterapia contra el cáncer utilizando este tipo de células. Este tipo de inmunoterapia involucra generar células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica en un periodo de cultivo de 5 a 7 días utilizando citocinas recombinantes y antígenos. Una vez que estas células se capacitan *in vitro*, son reinfundidas al paciente con el fin de estimular a los linfocitos T y así levantar una respuesta citotóxica en contra de las células cancerosas. Aunque este procedimiento posee ventajas como lo es la nula toxicidad hacia el paciente atribuida a la naturaleza autóloga de las células a reinfundirse, el alto costo del tratamiento limita la disponibilidad del mismo a personas de nivel socioeconómico bajo y medio. Debido a esto, la búsqueda de nuevas moléculas de bajo costo que sean capaces de inducir diferenciación celular son necesarias. A pesar de que muchos biomateriales (alginato, agarosa y quitosano) son capaces de sobreexpresar marcadores específicos de células dendríticas, el quitosano ha sido el más estudiado debido a su biocompatibilidad y nula toxicidad. Este ha sido evaluado como una película fina sobre monocitos aislados de sangre periférica humana y células dendríticas inmaduras de ratón procedentes de medula ósea en combinación con IL-4 y GM-CSF. Del mismo modo, su efecto a escala nanométrica ha sido estudiado sobre células dendríticas inmaduras aisladas de bazo de ratón. A pesar de que el potencial del quitosano para sobreexpresar marcadores específicos de células dendríticas ya ha sido evaluado, actualmente no hay estudios que evalúen el potencial de las nanopartículas de quitosano como agente inductor de diferenciación de monocitos humanos hacia células dendríticas sin hacer uso de citocinas recombinantes. En la presente investigación, se sintetizaron nanopartículas de quitosano mediante gelación iónica. Se obtuvieron nanopartículas de 208 nm de tamaño promedio, con carga superficial positiva y de morfología irregular. Los niveles de endotoxina de las mismas resultaron encontrarse dentro de los límites permisibles establecidos por el departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos. Se aislaron monocitos humanos de sangre periférica utilizando ficoll. Las células obtenidas fueron tratadas con nanopartículas solas (0.30 mg/mL) o en combinación con albumina de pollo (1 mg/mL) y un adyuvante (Hemocianina: 10ng/mL) durante 7 días. El análisis de citometría de flujo reveló que las células tratadas mostraron un incremento de expresión de marcadores celulares involucrados en señales co-estimuladoras (CD80), maduración de células dendríticas (CD83), presentación de antígeno (HLA-II) y moléculas involucradas en la fijación de lipopolisacárido (CD14). El ensayo FITC-dextran demostró la capacidad de las células para realizar el proceso de fagocitosis, mientras que el análisis morfológico (60X) reveló células con prolongaciones celulares y pseudópodos.

2. Abstract

Dendritic cells are antigen-presenting cells known as immune sentinel cells. The ability of these cells to process and present foreign antigens are the basics of dendritic cell-based cancer immunotherapy. This treatment involves the generation of dendritic cells from a source of human peripheral blood monocytes within 5 to 7 days using cytokines and different antigen sources. Once the cells are fully matured *in vitro*, they are infused back into the patient where the treatment stimulates T-cells to attack cancer cells. Although this procedure has advantages such as non-toxicity due to the autologous nature of infused cells, the high cost of the therapy is a disadvantage that makes the therapy unavailable for low and middle income people. For this reason, the need for new low-cost molecules able to induce cell differentiation is required. While many biomaterials (alginate, agarose and chitosan) possess the ability to upregulate specific dendritic cell markers, chitosan has been the most studied due to its properties such as biocompatibility and non-toxicity. This polymer has been assessed as a thin film on monocytes isolated from human peripheral blood and mouse bone marrow in combination with GM-CSF and IL-4. Another related research involves the effect of this polymer as a nanometric system on immature dendritic cells isolated from mouse spleen. Although the capacity of chitosan to upregulate specific mature dendritic cell markers has already been studied, at the moment there are no studies evaluating the effect of chitosan nanoparticles as a cell differentiation agent from a human peripheral blood monocyte phenotype to a dendritic cell phenotype without the use of any cytokine. In the present research, chitosan nanoparticles were synthesized by ionotropic gelation. The procedure allows us to obtain chitosan nanoparticles with an average size of 208 nm, positively charged surface and irregular-shaped morphology. The endotoxin level found on chitosan nanoparticles was within limits set by the United States department of health and human services. Human peripheral blood monocytes were isolated by density gradient centrifugation using ficoll. The obtained cells were pulsed with chitosan nanoparticles alone (0.30 mg/mL) or in combination with chicken albumin (1 mg/mL) and keyhole limpet hemocyanin (10ng/mL) as adjuvant in a time period of 7 days. Flow cytometric analysis showed that cells treated with chitosan nanoparticles alone or in combination with antigen and adjuvant express high levels of specific cell markers involved in costimulatory signals (CD80), maturation of dendritic cells (CD83), antigen presentation (HLA-II) as well as molecules involved in LPS fixation (CD14). FITC-dextran assay revealed the capacity of treated cells to perform phagocytosis while morphological cell analysis (60X) showed cells with irregular membrane projections and pseudopod.

3. Introducción

Las células dendríticas se catalogan como los centinelas del sistema inmunológico ya que estas se encuentran constantemente monitoreando su microambiente en busca de patógenos o de antígenos tumorales. Estas células constituyen la frontera entre la respuesta inmune innata y adaptativa ya que gracias a su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos resultan ser células presentadoras de antígeno por excelencia. Este tipo de células son actualmente utilizadas en inmunoterapias de tipo autólogo para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico resistente que actualmente se comercializa en los Estados Unidos bajo el nombre comercial de PROVENGE®. El objetivo de la inmunoterapia es el de generar células dendríticas autólogas a partir de monocitos de sangre periférica que al ser reinfundidos al paciente serán capaces de activar células T CD8⁺ efectoras específicas de tumor que tengan el potencial de reducir el volumen tumoral y a su vez inducir memoria inmunológica. La capacidad de estas células para interactuar con patrones moleculares distintos se atribuye a receptores específicos (receptores tipo *toll* y lectina C) los cuales son clave para reconocer una amplia variedad de moléculas e inducir activación celular. Los procesos de activación y maduración de estas células involucran la pérdida y ganancia de marcadores de superficie característicos de distintos linajes celulares, alteración de la capacidad fagocítica, cambios morfológicos y de comportamiento en cultivo celular, entre otros. Dada a la amplia gama de patrones moleculares que los receptores tipo *Toll* son capaces de reconocer (lipopolisacáridos, lipoproteínas, lipopéptidos, flagelina, RNA de doble cadena, islotes CpG y DNA), en años recientes se ha investigado el efecto de cultivar monocitos sobre una amplia gama de biomateriales en forma de una película fina (alginato, agarosa, quitosano, ácido hialurónico, poli (ácido láctico-co-glicólico) y quitosano) con la finalidad de evaluar su efecto en la diferenciación de estos hacia células dendríticas y potencial utilización en los protocolos actualmente establecidos. A pesar de que las películas de quitosano han mostrado tener importantes resultados con respecto al potencial de este polímero para inducir diferenciación celular, los estudios llevados a cabo poseen desventajas que imposibilitan el uso del quitosano a nivel clínico en terapias de tipo autólogo. La degradación de las películas de quitosano durante el cultivo celular contribuye a obtener una baja pureza celular y abundante contaminación de fragmentos poliméricos de gran tamaño. Lo anterior dificulta posteriores análisis (citometría de flujo) necesarios para monitorear el estadio de maduración celular y además obliga a realizar metodologías de purificación celular. Debido a lo anterior, un sistema a escala nanométrica basado en este polímero cuyas condiciones de síntesis permitan eliminar las desventajas anteriormente mencionadas sería un potencial agente de diferenciación celular el cual podría integrarse a protocolos actualmente aceptados.

4. Antecedentes.

4.1. Introducción: células dendríticas.

4.1.1. Biología de las células dendríticas.

Los antígenos necesitan ser procesados y presentados por células presentadoras de antígeno antes de que puedan ser reconocidos por células efectoras específicas (Chung *et al.*, 2004). Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno que juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune adaptativa. Estas células han sido catalogadas como células presentadoras de antígeno profesionales, ya que tienen la capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos de forma específica a las células T, generando así respuestas inmunes específicas (Begoña *et al.*, 2012).

Las células dendríticas se encuentran en tejidos, órganos linfoides y no linfoides, así como circulantes en linfa aferente y sangre periférica (Begoña *et al.*, 2012). Fuera de los tejidos linfoides, estas células son abundantes en piel, faringe, esófago alto, vagina, ectocérvix y en las superficies de las mucosas de los sistemas respiratorio y gastrointestinal (Niess *et al.*, 2005). Estas células también se han descrito en corazón, hígado, parénquima pulmonar y lámina propia del intestino. En el cerebro no se han descrito; sin embargo, las células de la microglía se asemejan a células dendríticas por su morfología y por sus marcadores de superficie celular (Begoña *et al.*, 2012).

La característica morfológica principal de las células dendríticas es la presencia de numerosas prolongaciones que se extienden desde el centro de la célula y pueden tomar la forma de dendritas (similares a las neuronas), pseudópodos o velos (Wieder *et al.*, 2003). Estas células extienden sus prolongaciones entre las estrechas uniones de las células epiteliales sin alterar la función de la barrera epitelial. Lo anterior aumenta la captura de antígenos del entorno incluso si no hay infección o inflamación (Rescigno *et al.*, 2001).

Además de las abundantes prolongaciones citoplasmáticas, estas células poseen estructuras intracelulares abundantes en su citoplasma relacionadas con la capacidad de procesar antígenos; endosomas, lisosomas y gránulos de Birbeck de las células de Langerhans de la epidermis (Begoña *et al.*, 2012).

Durante la época en que se describieron las células dendríticas, se consideraba a los macrófagos como los principales presentadores de antígeno en el sistema inmunológico, ya que estos eran más abundantes, se distribuían uniformemente en el cuerpo humano y se sabía que poseían la capacidad de presentar antígenos a otras células. (Wieder, 2003). Lo anterior empezó a perder fuerza a medida que Steinman empezó a realizar observaciones y publicaciones respecto a otra población celular distinta a los macrófagos (Steinmann et al., 1975; Steinman *et al.*, 1979). Mediante variadas técnicas de separación celular logró enriquecer una población de células procedentes de tejidos linfoides que parecían mucho más eficaces que los macrófagos promoviendo la proliferación de células T aloreactivas (Steinman *et al.*, 1983).

Los conocimientos biológicos sobre este nuevo tipo celular avanzaron lentamente en la década de los 80's, debido a la complejidad metodológica derivada de la purificación de una población minoritaria de los tejidos linfoides. Este panorama cambió radicalmente en los 90's ya que una serie de descubrimientos metodológicos (combinación de citocinas recombinantes con antígenos de distinta naturaleza) permitieron llevar a cabo procesos de diferenciación *in vitro* de células que compartían marcadores celulares y características funcionales con las células dendríticas (Felzmann *et al.*, 2003). El desarrollo de estas metodologías permitió llevar a cabo la maduración celular *in vitro* y su posterior purificación, permitiendo así tener un mejor conocimiento de su biología y funciones que en los últimos años han permitido el desarrollo de ensayos clínicos basados en el uso de células dendríticas en el campo de la inmunoterapia antitumoral y antiinfecciosa, para inducir tolerancia postrasplante o en patologías autoinmunes (Begoña *et al.*, 2012).

Las células presentadoras de antígeno tienen dos funciones importantes en la activación de los linfocitos T. En primer lugar, las células presentadoras de antígeno convierten los antígenos proteicos en péptidos y muestran complejos péptido-MHC para que sean reconocidos por los linfocitos T. La conversión de proteínas originales en fragmentos peptídicos asociados al MHC que sintetizan las células dendríticas se denomina procesamiento de antígeno. En segundo lugar, se requiere de estímulos que van más allá de los que ponen en marcha mediante el reconocimiento de los complejos péptido-MHC por el

receptor del antígeno de los linfocitos T. Estos estímulos, denominados coestimuladores, son necesarios para que se produzcan las respuestas completas de los linfocitos T (Abbas *et al.*, 2008).

Las células dendríticas inmaduras se reclutan en tejidos periféricos donde se lleva a cabo el proceso inflamatorio. La internalización de partículas extrañas puede subsecuentemente activar la maduración y migración hacia los órganos linfoides. Las respuestas mediadas por quimiocinas y la expresión de receptores de quimiocina son componentes esenciales en el reclutamiento de células dendríticas y migración de las mismas para presentar entonces el antígeno capturado. Las células dendríticas inmaduras expresan los receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 y CXCR1 (R&D Systems, 2002). De este modo, las células dendríticas son quimioatraídas hacia las áreas de inflamación principalmente por MIP-3 alfa/CCL20, y también en respuesta a RANTES/CCL5 y MIP-1 alfa/CCL3 (R&D Systems, 2002).

Las células dendríticas en reposo (inmaduras) expresan receptores de membrana que se unen a patógenos, como los receptores para manosa. Estas células emplean estos receptores para captar antígenos microbianos, endocitarlos y comenzar a procesar las proteínas para obtener péptidos capaces de unirse a las moléculas de MHC. Las células dendríticas también expresan receptores tipo *toll* que reconocen moléculas microbianas y activan a los linfocitos para que secreten citocinas e inicien su proceso de maduración (Abbas *et al.*, 2008).

Una vez captado el antígeno por las células dendríticas, este necesita ser procesado y presentado en su superficie para así estimular a los linfocitos T. El procesamiento del antígeno consiste en la conversión de proteínas originales en péptidos asociados a moléculas MHC. Este proceso consiste en la introducción de antígenos proteicos exógenos en el interior de las células dendríticas o la síntesis de antígenos en el citosol, la degradación proteolítica de estas proteínas en péptidos, la unión de los péptidos a las moléculas de MHC y la presentación de los complejos péptido-MHC en la superficie de las células dendríticas para que sean reconocidos por los linfocitos T. Por lo tanto, las proteínas tanto extracelulares como intracelulares se muestrean mediante estas vías de procesamiento del antígeno y las moléculas del MHC presentan péptidos derivados de

proteínas normales propias y de proteínas extrañas para permitir la vigilancia por parte de los linfocitos T (Abbas *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo la presentación de moléculas MHC de clase I, las cuales estimulan a los linfocitos T CD8⁺, el antígeno es capturado por fagocitosis o endocitosis asociada a receptores y entonces es introducido al citosol. Aquí ocurre la degradación vía proteosoma y los péptidos resultantes son transportados hacia el retículo endoplásmico mediante un transportador dependiente de ATP denominado TAP. Los dímeros MHC de la clase I- β_2 -microglobulina recién sintetizados en el retículo endoplásmico se unen al complejo TAP y reciben péptidos transportados hacia el interior del RE. Los complejos estables formados por moléculas MHC de clase I y los péptidos unidos salen del retículo endoplásmico a través del complejo de Golgi, hacia la superficie (Wieder, 2003).

La presentación de moléculas MHC de clase II, las cuales estimulan a los linfocitos T CD4⁺, se inicia con la interiorización de proteínas extracelulares en endosomas, donde esas proteínas se escinden mediante proteólisis por enzimas que actúan a pH ácido. Las moléculas de MHC de clase II recién sintetizadas se transportan desde el retículo endoplásmico a las vesículas endosómicas. Aquí, la I_i se degrada proteolíticamente y la molécula DM elimina un pequeño péptido residual de I_i, denominado CLIP del sitio de unión peptídica de la molécula MHC. Los péptidos que se generan a partir de las proteínas extracelulares se unen entonces a los lugares libres de la molécula MHC clase II y el complejo trimérico se desplaza hacia la superficie celular, donde se presenta (Wieder, 2003).

Luego de haber sido capturado y procesado el antígeno, la célula dendrítica migra hacia la zona T de los órganos linfoides. El proceso de migración está regulado por la interacción de quimiocinas y receptores de quimiocinas. Las células dendríticas maduras pierden la capacidad de responder a MIP-3-alfa/CCL20, RANTES/CCL5 y MIP1-alfa/ccl3, y se vuelven entonces sensibles a MIP-3 beta/CCL19. El proceso de maduración, también trae consigo la pérdida de la expresión de moléculas de superficie; CCR1, CCR5 y CCR6, la sobreexpresión de CXCR4 y CCR7, y la disminución de CXCR1. La sobreexpresión de CCR7 promueve la capacidad de respuesta a MIP-3 beta/CCL19 y 6CKine/CCL21. 6CKine/CCL21, una potente quimiocina para células dendríticas maduras y células T

vírgenes colocaliza ambas células en la zona T de los órganos linfoides y de este modo se promueve la activación de la célula T. La maduración de las células dendríticas también induce la producción de MDC/CCL22, TARC/CCL17 (quimiocinas que atraen células T que expresan CCR4) y PARC/CCL18. La producción de la quimiocina CXCL16 en la zona de células T de los órganos linfoides promueve la interacción entre células dendríticas y células T CD8⁺ (R&D Systems, 2002).

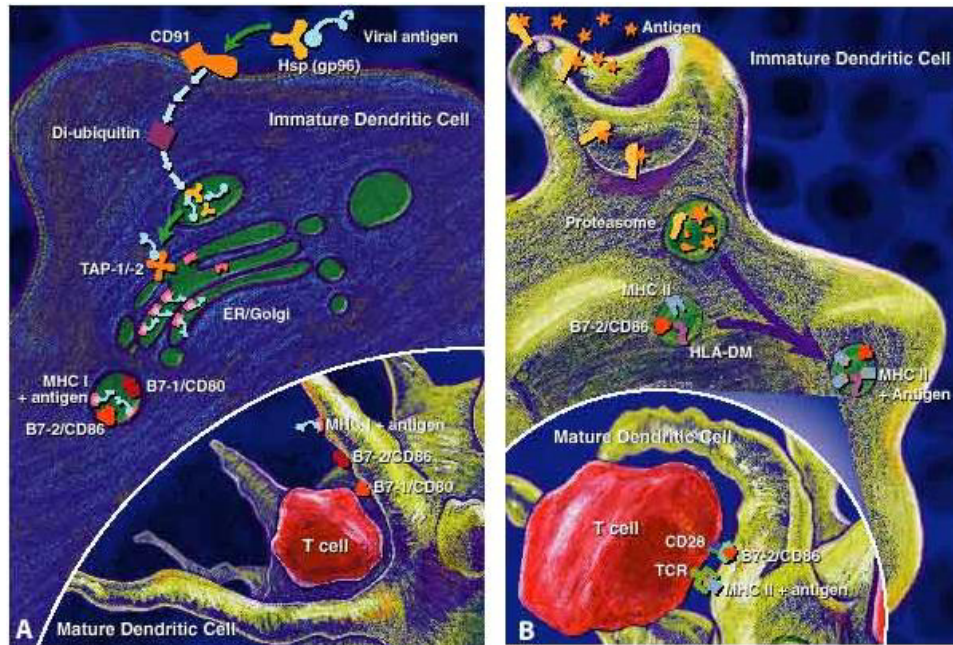


Figura 1. Vías de procesamiento y presentación de antígeno (R&D Systems, 2002).

Los receptores de superficie no solo facilitan la captura del antígeno, sino también median el contacto físico necesario entre células dendríticas y células T. La molécula de adhesión ICAM-3 presente en células dendríticas se une con gran afinidad a LFA-1 en los linfocitos T y son esenciales para la formación de la sinapsis inmunitaria. La formación de la sinapsis inmunitaria se divide en tres eventos. En el primer evento, el TCR interactúa con el complejo MHC-péptido en la periferia del área de contacto, mientras que las moléculas de adhesión LFA-1 e ICAM-1 interactúan en el centro (Grakoui *et al.*, 1999).

En el segundo evento, los papeles se invierten. Por último, el TCR interactúa con el complejo MHC péptido que se ubican en el centro del área de contacto, mientras que las

moléculas de adhesión forman un anillo en la periferia estabilizando así el contacto entre la célula dendrítica y el linfocito virgen (Tseng and Dustin, 2002).

La activación de las células T vírgenes requiere de al menos dos señales: Una señal de activación por el complejo MHC-péptido y otra por moléculas co-estimuladoras. Aunque existen muchas familias de moléculas co-estimuladoras, los miembros de la familia B7 son las principales moléculas implicadas en la activación de células T. Los miembros de la familia B7 más estudiados son CD80 y CD86; sus interacciones con CD28 y CTLA-4 en linfocitos T están ampliamente estudiadas. CD28 se expresa constitutivamente en células T humanas y de ratón. Una vez que interactúa con CD80 y CD86 dirige señales co-estimuladoras positivas (Thompson *et al.*, 1989) que promueven la producción de IL-2 vía mecanismos transcripcionales (Fraser *et al.*, 1991) y post-transcripcionales (Lindstein *et al.*, 1989). CTLA-4, cuya expresión es nula en células T vírgenes pero que tras activación celular (Chambers *et al.*, 2001) puede inducirse transcripcionalmente, conlleva a una señal negativa que antagoniza las señales de CD28 y por ende limita la magnitud y duración de la activación de células T (Waterhouse *et al.*, 1996).

La co-estimulación juega un papel cuantitativo en la activación de las células T, amplificando la señal que desencadena el TCR. En las células T vírgenes, el compromiso molecular entre CD28 y CD80 conlleva a la formación de la sinapsis inmunitaria madura, importante complejo que permite transmitir señales hacia los linfocitos T vírgenes (Bromley *et al.*, 2001). Este compromiso molecular inicia activamente el transporte de dominios de proteínas y lípidos hacia el área de contacto de interacción entre células con activación de miosina (Wulfig *et al.*, 1998). La co-estimulación a través de CD28 incrementa la activación de la tirosina quinasa Lck, la cual es la primera tirosina quinasa en ser activada durante la transducción de señales dirigidas por TCR. La actividad de Lck está regulada por CD4 y CD28 durante la sinapsis inmunitaria (Holdorf *et al.*, 2002). La co-localización de CD86 con la molécula MHC de clase II sugiere que las moléculas co-estimuladoras se ensamblan con los complejos MHC-péptido para acelerar la formación de los SMAC centrales (Turley *et al.*, 2000).

Otras moléculas ligando co-estimuladoras que pueden activar e inhibir la proliferación de las células T son B7-DC y B7-H1 (Dong *et al.*, 1999). Estos ligandos pueden inhibir la proliferación de linfocitos T anteriormente activados cuando se unen al receptor de muerte programada 1. PD-1 es un receptor de inhibición que se distingue de CD28, CTLA-4 e ICOS. Este último, es un co-estimulador inducible expresado 12 horas después de la activación de las células T y posee afinidad por ICOS-L (B7h, B7RP-1), el cual co-estimula de manera positiva a las células T (Swallow *et al.*, 1999). La expresión de ICOS es dependiente del complejo CD80/CD86-CD28 (Tseng and Dustin, 2002).

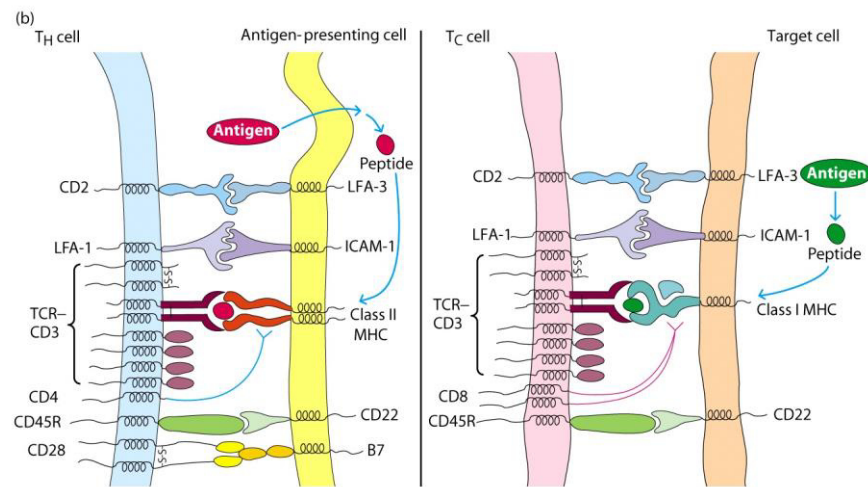


Figura 2. Moléculas de superficie celular involucradas en la sinapsis inmunológica. Señal 1 de estimulación corresponde a la interacción del MHC con el TCR. La segunda señal de estimulación involucra a moléculas accesorias con actividad co-estimuladora (Abbas *et al.*, 2008).

El tipo de respuesta consiguiente de los linfocitos T depende de varios factores, como la concentración antigénica de células dendríticas, la afinidad del TCR por el MHC, la duración de la interacción de la célula dendrítica con el linfocito T, el estado de maduración de la célula dendrítica, y el tipo de estímulo responsable de la maduración de la célula dendrítica. La supervivencia a largo plazo de los linfocitos T y su diferenciación a células de memoria y efectoras requiere la interacción con células dendríticas maduras (Begoña *et al.*, 2012).

Tras su activación, los linfocitos T vírgenes sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citocinas y células de memoria. Además de la señal iniciada por el complejo MHC-péptido y moléculas co-estimuladoras, las células dendríticas secretan citocinas (IL-12) que polarizan las poblaciones de linfocitos (Abbas *et al.*, 2008). El efecto de esta citocina es influenciar a las células T vírgenes (junto con otras señales estimuladoras mencionadas) a adquirir un fenotipo de Th1. Las células natural killer también responden a la IL-12 que se encuentra en el ambiente y procede entonces a liberar IFN- γ , el cual refuerza la capacidad de las células dendríticas de producir IL-12. Mientras las células T vírgenes maduran, las células Th1 producen también IFN- γ que junto con las células NK estimulan a células vírgenes a diferenciarse hacia más células con fenotipo Th1, generando entonces un ciclo autocrino dependiente de IL-12 e IFN- γ (Parris, 2003).

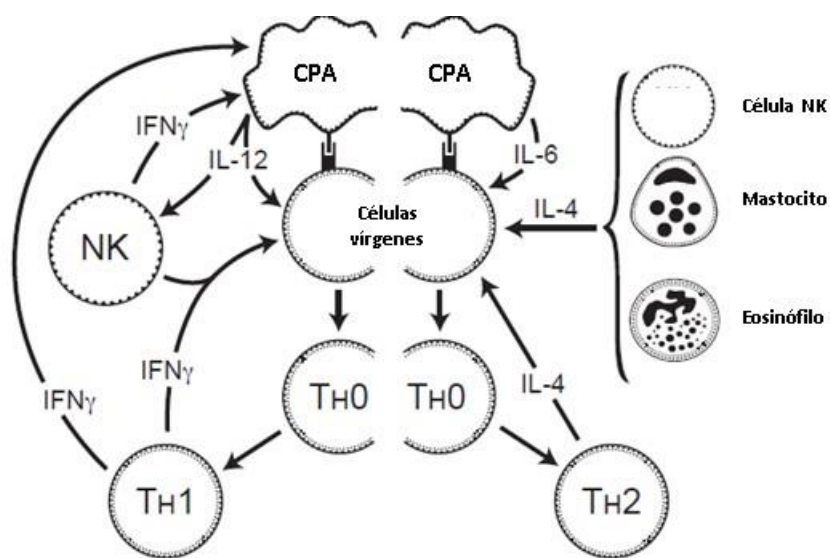


Figura 3. Diferenciación de linfocitos T vírgenes a células Th1 y Th2. Los linfocitos CD4⁺ pueden diferenciarse hacia células Th-1, que producen IFN- γ secundan una respuesta de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, o hacia linfocitos Th-2, que producen IL-4, IL-5 e IL-13, e implican inmunidad humoral y disminución de la respuesta Th-1(Parris, 2003).

Al igual que las células Th1, la generación de células con fenotipo Th2 depende de las citocinas que se encuentren en el ambiente. La inclinación hacia el fenotipo Th2 es inducida principalmente por la IL-6 que procede de las células presentadoras de antígeno. Además de IL-6, la IL-4 secretada por las células NK, mastocitos y eosinófilos inducen la

generación de células cooperadoras con fenotipo Th2. Una vez que estas células Th2 maduran, estas empiezan a producir IL-4, que junto con las otras células que se encuentran en el ambiente participan en generar un ciclo autocrino para la generación de células Th2 dependiente de IL-4 e IL-6 (Parris, 2003).

El IFN- γ secretado por las células Th1 puede bloquear la proliferación de las células Th2, mientras que altas concentraciones de IL-4 e IL-6 pueden bloquear la generación de células Th1. Las células T reguladoras, son otro tipo célula que puede regular poblaciones celulares y bloquear la proliferación de células Th1 y Th2. Existen sub poblaciones de células T reguladoras (células Tr) que han sido identificadas y que parecen tener funciones efectoras distintas además de poseer moléculas de superficie diferentes (McGuirk *et al.*, 2002).

Las células T reguladoras de tipo 1 secretan altas y bajas cantidades de IL-10 para así modular los niveles de TGF- β . Las células T reguladoras de tipo 3 secretan principalmente TGF- β y las células CD4⁺ CD25⁺ inhiben la respuesta inmune a través del contacto célula-célula. Las células Tr CD8⁺ secretan IL-10 o TGF- β . Estudios funcionales indican que las células Tr1 y otras poblaciones de Tr quizá ayuden a eliminar la respuesta inflamatoria a patógenos, tumores y aloantígenos iniciada por células Th1 (Groux *et al.*, 1997)

La cooperación de los linfocitos T CD4⁺ en el momento de la activación es necesaria para generar linfocitos T CD8⁺ memoria. Se cree que esta interacción está mediada por la unión entre la molécula CD40 de la célula dendrítica y su ligando en el linfocito CD4⁺ activado, el CD40L (Schoenberger *et al.*, 1998), aunque hay estudios que sugieren una interacción directa entre los linfocitos CD4⁺ y el CD40 de los linfocitos CD8⁺ (Bourgeois *et al.*, 2002). Otras moléculas que se han implicado en la generación de células de memoria y en las respuestas duraderas son proteínas pertenecientes a las familias de CD28 y del receptor de TNF (Begoña *et al.*, 2012).

Además de su papel central en la activación de los linfocitos T, las células dendríticas interactúan directamente con células NK, células NKT y linfocitos B. Las células dendríticas maduras e inmaduras pueden activar e inducir la expansión de células NK *resting* por mecanismos no aclarados totalmente, aunque se han descrito algunos proteínas y factores solubles implicados (Jinushi *et al.*, 2003).

Las células dendríticas activadas también inducen directamente la proliferación de linfocitos B, el cambio de isotipo de inmunoglobulinas y su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos; estas acciones las pueden llevar a cabo tanto de forma linfocito T-dependiente como linfocito T-independiente (Begoña *et al.*, 2012).

Las células dendríticas estimulan a los linfocitos T de una manera mucho más potente que los macrófagos o los linfocitos B. Su expresión de moléculas de MHC es entre 10 y 100 veces mayor que la de los linfocitos B. Imágenes a tiempo real de células dendríticas murinas y linfocitos T virgen en ganglios linfáticos intactos revelan que una célula dendrítica puede interaccionar hasta con 500 linfocitos T en una hora (Romani *et al.*, 1994).

4.1.2. Células dendríticas y su papel en la inmunoterapia celular.

Sipuleucel-T (PROVENGE®) es una terapia de tipo autólogo para el tratamiento contra el cáncer de próstata metastásico resistente. Esta terapia se encuentra disponible en los Estados Unidos y fue aprobada por la FDA en 2010. Sipuleucel-T consiste en agendar una cita al paciente con un médico especializado el cual se encargara de dar seguimiento a la terapia y de monitorear el estado de salud del paciente durante todo el proceso. La terapia inicia con la obtención de células mononucleares de sangre periférica del paciente mediante leucoferesis en un centro especializado de colecta sanguínea. Tras este proceso, las células se envían a los laboratorios DENDREON en New Jersey, los cuales están calificados para manufacturar el producto final. En estos laboratorios se generan y activan células dendríticas procedentes de precursores celulares contenidos en la sangre utilizando una proteína recombinante humana denominada PAP-GM-CSF. Esta proteína es el resultado de fusionar un activador inmunológico (GM-CSF) con fosfatasa ácida prostática, un antígeno altamente expresado en el cáncer de próstata (Enock Anassi *et al.*, 2011).

Los componentes biológicamente activos de Sipuleucel-T PROVENGE son las células presentadoras de antígeno y la proteína recombinante PAP-GM-CSF (PA2024). Durante el cultivo *in vitro* realizado en el laboratorio, el antígeno recombinante es fijado y procesado por células presentadoras de antígeno en fragmentos de menor tamaño que permitirán sensibilizar células del sistema inmune adaptativo (linfocitos) y dirigir entonces su actividad citotóxica específica en contra de las células malignas de cáncer de próstata. (Dendreon Corporation, 2014).



Figura 4. Proceso de manufactura de Sipuleucel-T (PROVENGE®).

La composición celular de Sipuleucel-T PROVENGE depende de la composición de las células obtenidas de los pacientes mediante leucoferesis. Además de las células presentadoras de antígeno, el producto final contiene células T, células B, células NK entre otras. El número de células y la composición de las mismas en cada dosis de PROVENGE pueden variar. Cada dosis de PROVENGE contiene un mínimo de 50 millones de células autólogas CD54 positivas activadas con PAP-GM-CSF y suspendidas en 250 mL de una solución láctica de Ringer. La vacuna se aplica cada dos semanas durante 60 minutos en tres dosis y si una dosis no es aplicada, se requerirá otro proceso de leucoféresis para continuar y completar el tratamiento. Por último se verifica que el producto final corresponda al paciente a tratar y no posea agregados durante el proceso de infusión. (Dendreon Corporation, 2014).

La potencia de PROVENGE es en parte determinada por el incremento en la expresión de la molécula CD54, también conocida como ICAM-1, en la superficie de las células presentadoras de antígeno después de ser cultivadas con PAP-GM-CSF. CD54 es una molécula de superficie celular que juega un papel importante en la interacción inmunológica entre las células presentadoras de antígeno y linfocitos T, es considerado como un marcador de activación celular (Sheikh NA *et al.*, 2008).

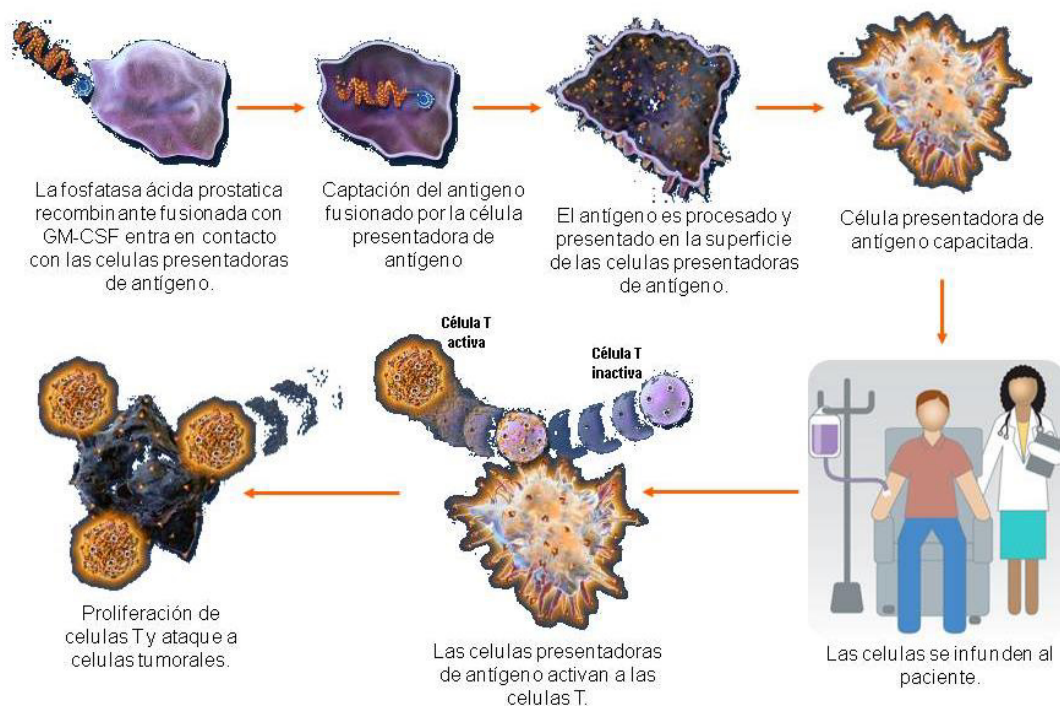


Figura 5. Mecanismo de acción de Sipuleucel-T (Provenge®).

A pesar de que la terapia ha sido aprobada por la FDA y es comercializada en la actualidad, los pacientes que se someten a ella pueden presentar eventos adversos durante su tratamiento. En un estudio donde 601 pacientes con cáncer de próstata fueron sometidos a leucoféresis al menos una vez y en los que fueron evaluados eventos adversos, 98.3% del grupo tratado con sipuleucel-T y 96% del grupo placebo presentaron eventos adversos. Los eventos adversos más comunes en el grupo sipuleucel-T incluyeron: resfriados, fatiga, fiebre, dolor de espalda, náusea, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza, vómito, anemia, dolor en las extremidades, mareos, dolor muscular, diarrea entre otros. Cerca del 67.4% de los eventos adversos resultaron ser moderados en severidad y

estuvieron relacionados con la infusión. Los eventos adversos severos o que atentaban contra la vida ocurrieron en un 27.6% en el grupo sipuleucel-T y en un 28.4% en el grupo placebo. Se reportó un 3.3% de mortalidad en el grupo sipuleucel-t y un 3.5% en el grupo control. Dolor de espalda y fiebre fueron las severidades más comunes reportadas en el grupo sipuleucel-t. (Kantoff *et al.*, 2010).

Incidencia de eventos adversos presentes en 10 % o más pacientes que recibieron Sipuleucel-T (Provenge).		
Evento adverso	Sipuleucel-T (N= 601) N (%)	Placebo (N=303) N (%)
Resfriados	319 (53.1)	33 (10.9)
Fatiga	247 (41.1)	105 (34.7)
Fiebre	188 (31.3)	29 (9.6)
Dolor de espalda	178 (29.6)	87 (28.7)
Nauseas	129 (21.5)	45 (14.9)
Dolor de articulaciones	118 (19.6)	62 (20.5)
Dolor de cabeza	109 (18.1)	20 (6.6)
Parestesia	85(14.1)	43(14.2)
Vomito	80(13.3)	23 (7.6)
Anemia	75(12.5)	34(11.2)
Estreñimiento	74(12.3)	40(13.2)
Dolor	74 (12.3)	30(6.6)
Parestesia oral	74(13.3)	43(14.2)
Dolor en las extremidades	73(12.1)	40(13.2)
Mareos	71(11.8)	34(11.2)
Dolor muscular	71(11.8)	17(5.6)
Astenia	65(10.8)	20 (6.6)
Diarrea	60(10.0)	34(11.2)

Tabla 1. Eventos adversos reportados durante la terapia con sipuleucel-T (Provenge®).

4.2. Generación de células dendríticas humanas.

4.2.1. Diferenciación de células dendríticas con estímulos exógenos y endógenos.

En el pasado, el estudio de las células dendríticas se encontraba restringido dado a la baja abundancia de estas células en sangre periférica y en tejidos. Investigaciones a finales de los años 80's y principio de los 90's señalaban que se podían generar grandes cantidades de células dendríticas a partir de células precursoras de médula ósea (CD34⁺) o de monocitos (CD14⁺) *in vitro*. La capacidad de generar células dendríticas funcionales *in vitro* ha

permitido estudiar y entender sus mecanismos de interacción con otras células del sistema inmunológico, además de ser utilizadas con fines terapéuticos en la práctica clínica (Wieder, 2003).

Existen múltiples linajes y rutas de diferenciación para las células dendríticas y al menos dos precursores de células dendríticas se encuentran en el humano. Las células dendríticas mieloides se derivan de monocitos de sangre periférica cultivados con IL-4 y GM-CSF (Romani *et al.*, 1994) o después de fagocitosis y migración transendotelial (Randolph *et al.*, 1998). Por otra parte, las células dendríticas linfoides se derivan de células plasmocitoides de sangre o de las amígdalas después de haber sido cultivadas con IL-3 (Olweus *et al.*, 1997).

La generación *in vitro* de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica involucra la capacidad de las células para adherirse a la superficie de la placa de cultivo y reaccionar a estímulos con citocinas recombinantes inductoras de diferenciación hacia un fenotipo de célula dendrítica. Los monocitos (CD14⁺) son células que pueden adherirse a la placa de cultivo y ser entonces separadas del resto de las células mononucleares de sangre periférica. Las células dendríticas inmaduras (CD14^{mod} CD45⁺ CD83⁻) tras algún estímulo inicial, se caracterizan por presentar propiedades de adherencia y no adherencia mientras que las células dendríticas maduras (CD14⁻ CD80⁺ CD83⁺ CD86⁺) son no adherentes en su totalidad. Existen múltiples estímulos exógenos y endógenos que conllevan la diferenciación de células dendríticas inmaduras hacia un fenotipo maduro. Entre estos estímulos se incluyen el ligando CD40 (principalmente expresado en linfocitos T CD4⁺ activados), citocinas como GM-CSF, TNF- α , IL-1, prostaglandina E₂, LPS bacteriano (Sallusto *et al.*, 1995), células bacterianas (Winzler *et al.*, 1997), RNA de doble cadena viral (Cella *et al.*, 1999), oligonucleótidos CPG (Verdijk *et al.*, 1999) entre otros. Por otra parte la IL-10 (Allavena *et al.*, 1998), TGF- β (Ogata *et al.*, 1999) y el factor de crecimiento vascular endotelial (Oyama *et al.*, 1998) inhiben el proceso de maduración.

En respuesta al estímulo activador, las células dendríticas expresan altos niveles del factor de transcripción NF- κ B, principalmente involucrado en la síntesis de moléculas inflamatorias (Granilli-Piperno *et al.*, 1995). La maduración de las células dendríticas conlleva a que estas expresen en su superficie moléculas de MHC de clase II asociadas al

péptido y moléculas características de células dendríticas maduras como CD83 (Zhou *et al.*, 1995).

Las células dendríticas mieloides inmaduras pueden diferenciarse a partir de células CD34⁺ cultivadas con GM-CSF y TNF- α , o de monocitos CD14⁺ cultivados con GM-CSF e IL-4. Las células dendríticas mieloides pueden madurarse bajo diversos estímulos exógenos y endógenos. Las células dendríticas linfoides inmaduras pueden derivarse de las células plasmocitoides (CD14, IL-3⁺) de sangre o amígdalas después de haber sido cultivadas con IL-3 y de haber sido maduras con CD40 ligando (Chung *et al.*, 2004).

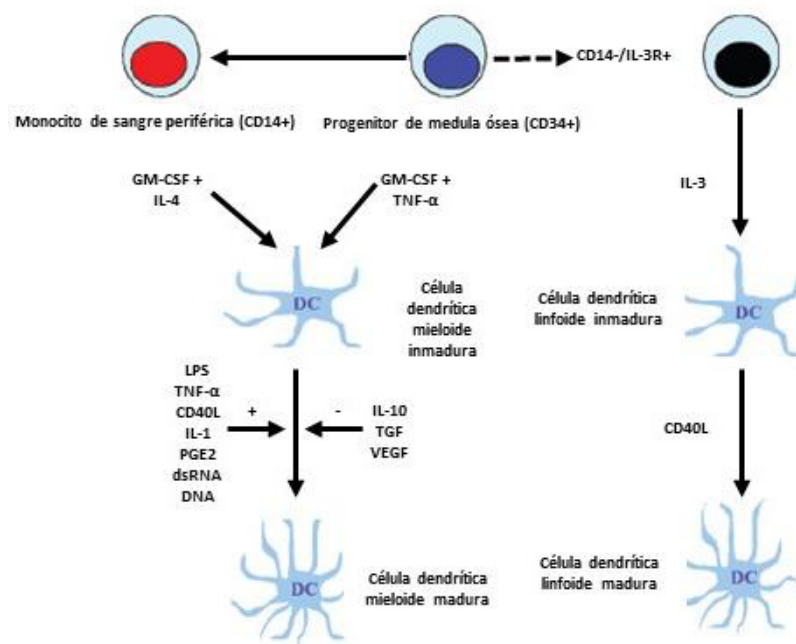


Figura 6. Diferenciación de células dendríticas con estímulos exógenos y endógenos. (Chung *et al.*, 2004).

Uno de los principales obstáculos en la identificación de células dendríticas es que a la fecha no se ha identificado un marcador de superficie exclusivo de estas células y estas se caracterizan entonces evaluando la presencia o ausencia de varios marcadores de superficie celular. Dentro de estos se incluyen; moléculas MHC de clase II y la ausencia de marcadores característicos de otros linajes celulares como lo son CD3 (células T), CD14 (monocitos), CD19 (células B), CD56 (células natural killer) y CD56b característico de granulocitos (Hart *et al.*, 1997).

El fenotipo de las células dendríticas varía a lo largo de los diferentes estados de maduración y activación. Los precursores circulantes en sangre pueden expresar CD2, CD4, CD13, CD16, CD32 y CD33, que van perdiendo gradualmente con la maduración (Takamizawa *et al.*, 1997).

Las células dendríticas expresan una variedad de moléculas de adhesión; CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-2), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3) y CD102 (Hart *et al.*, 1993). Estas células también expresan moléculas de tipo co-estimulador como CD80 (B7-1) y CD86 también llamado B7-2 (Takamizawa *et al.*, 1997), incrementan su expresión con la activación, principalmente tras la unión de CD40 a su ligando. CD86 es un marcador temprano de maduración, mientras que CD80 aparece más tardíamente y está ausente en los precursores circulantes (McLellan *et al.*, 1995).

La identificación fenotípica de las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica se puede lograr evaluando: altos niveles de complejos MHC de clase II, CD83 (marcador de maduración de células dendríticas), moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y la ausencia de marcadores específicos del linaje monocítico (CD14). De este modo, un análisis dual por citometría de flujo (two-color analysis) utilizando un coctel de marcadores específicos de linaje en un color y en el otro un marcador característico de células dendríticas es suficiente para su identificación (Wieder, 2003).

4.2.2. Limitaciones de los protocolos actuales de generación de células dendríticas.

La generación de células dendríticas humanas *in vitro* es un procedimiento que se divide en cinco fases: 1)- Extracción de sangre periférica, 2)- Aislamiento de células precursoras, 3)- Cultivo primario de precursores celulares, 4)- Estimulación celular *in vitro* y 5)- Evaluación fenotípica. Las etapas más costosas son el mantenimiento del cultivo durante 5 a 7 días bajo condiciones de esterilidad (instalaciones de cultivo celular adecuadas) con cambios recurrentes de medio de cultivo con antibiótico y la estimulación de estas células con citocinas recombinantes comerciales.

Las citocinas recombinantes a utilizarse dependerán del protocolo de generación de células dendríticas seleccionado. Existen protocolos de generación de células dendríticas humanas en periodos de tiempo de 2 días a 7 días. La elección del protocolo dependerá del grado de

diferenciación celular y la integridad celular que se pretenda adquirir. Los protocolos en cortos periodos de tiempo generan células dendríticas humanas con buena viabilidad celular pero con un grado de diferenciación intermedio, por otra parte aquellos con periodos de tiempo prolongados presentan un mayor grado de diferenciación pero su viabilidad se reduce entre un 30 a 40%. Estos protocolos están basados en dos estímulos celulares. En el primero se utiliza GM-CSF e IL-4 durante un periodo de tiempo de 2 a 5 días en combinación con un estímulo proinflamatorio durante 48 horas más. La primera es capaz de inducir a los monocitos a adquirir un linaje de célula dendrítica inmadura mientras que la segunda bloquea su diferenciación hacia un linaje de macrófago. El segundo estímulo consiste en exponer a las células a un coctel de citocinas recombinantes (GM-CSF, IL-4, IL-1 β , IL-6, PGE₂ y TNF- α) o lipopolisacárido en combinación con el antígeno que se desea pulsar las células.

Citocina	Casa comercial	Presentación	Costo (M.N.)
IL-4	Sigma-Aldrich	5 μ g	4,086.00
IL-4	Sigma-Aldrich	50 μ g	11,675.00
IL-4	Promokine	10 μ g	3,574.00
IL-4	R&D Systems	10 μ g	4,472.00
GM-CSF	Sigma-Aldrich	5 μ g	2,604.00
GM-CSF	Sigma-Aldrich	10 μ g	3,574.00
GM-CSF	R&D Systems	10 μ g	4,778.00
IL-1 β	Sigma-Aldrich	10 μ g	5,316.00
IL-1 β	Promokine	10 μ g	3,574.00
IL-1 β	R&D Systems	25 μ g	18,536.00
TNF- α	Sigma-Aldrich	10 μ g	5,658.00
TNF- α	Promokine	50 μ g	3,574.00
TNF- α	R&D Systems	20 μ g	4,472.00
PGE2	Sigma-Aldrich	1mg	3,880.00
PGE2	Promokine	25mg	10,399.00
PGE2	R&D Systems	10mg	3,179.00
IL-6	Sigma-Aldrich	20 μ g	6,268.00
IL-6	Promokine	20 μ g	3,574.00
IL-6	R&D Systems	10 μ g	4,993.00

Tabla 2. Principales citocinas recombinantes utilizadas en el proceso de diferenciación de células dendríticas y sus costos en el mercado.

Aunque el LPS ha mostrado generar diferenciación celular, este agente no es apto para utilizarse en cultivos celulares con fines de terapia autóloga debido a los potenciales riesgos de causar shock séptico al reinfundir al paciente las células además de las dificultades que representa la purificación del cultivo tras usar dicho agente. Las citocinas comerciales por su naturaleza recombinante tienen altos costos en el mercado y representan la principal limitante económica en el proceso de diferenciación celular.

4.3. Biomateriales como agentes inductores de diferenciación celular.

4.3.1. Estudios de diferenciación celular con biomateriales.

Park y Babensee, trataron células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos de sangre periférica de humano con distintas películas fabricadas de diversos biomateriales; alginato, agarosa, quitosano, ácido hialurónico y PLGA. Los tratamientos con quitosano y PLGA promovieron la diferenciación hacia células dendríticas maduras ya que estas células presentaban altos niveles de las moléculas (CD80, CD86, CD83, HLA-DQ y CD44) liberación de citocinas pro-inflamatorias y menor capacidad fagocítica. Las células dendríticas tratadas con alginato presentaron altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias en sus sobrenadantes en comparación con el control negativo (células dendríticas inmaduras) Las células dendríticas tratadas con las películas HA expresaron bajos niveles de CD40, CD80, CD86 y HLA-DR en comparación con el control negativo (células dendríticas inmaduras) así como también una menor capacidad fagocítica y niveles de expresión bajos de CD44 en comparación con el control (Park and Babensee, 2012).

Julia E. Babensee y Abhijit Paranjpe, generaron células dendríticas inmaduras a partir de monocitos de sangre periférica de humano (en el día 1 de cultivo se añadieron las citocinas GM-CSF e IL-4, en el día 5 las células adherentes y no adherentes se resuspendieron en medio con GM-CSF e IL-4 durante 48 y después las células eran evaluadas) y las trataron con películas de biomateriales comúnmente utilizados (ingeniería de tejidos, construcción de vacunas, etc.) para evaluar su efecto como inductores de diferenciación hacia células dendríticas maduras en comparación con el tratamiento de LPS (control positivo). Los materiales evaluados fueron los siguientes: alginato, agarosa, quitosano, ácido hialurónico y PLGA. Las células dendríticas inmaduras que se cultivaron con quitosano o

PLGA presentaron un incremento en moléculas de superficie características de células dendríticas maduras (CD86, CD40, HLA-DQ) en comparación al control negativo (células dendríticas inmaduras son LPS), similar a las células dendríticas tratadas con LPS, mientras que tratamientos como alginato y ácido hialurónico disminuyeron la expresión de las moléculas características de células dendríticas maduras (Babensee and Paranjpe, 2005).

Yong-Chong Lin y colaboradores cultivaron monocitos procedentes de médula ósea de ratón en superficies de quitosano con el fin de evaluar el efecto de este en la inducción hacia un fenotipo de célula dendrítica madura y su capacidad de protección contra tumor. Al comparar los monocitos cultivados en superficies de quitosano contra aquellos cultivados en superficies de poliestireno tradicionales (día 5 de cultivo con IL-4 y GM-CSF en ambos grupos) encontraron que el sistema basado en el biopolímero incrementó la agregación monocitaria y el desprendimiento celular, así como también la expresión de los marcadores celulares CD11c y CD14 (células dendríticas inmaduras). Al tratar ambos sistemas con LPS, encontraron que aquellos cultivos en quitosano presentaban mayor cantidad de IL-12 y tenían una mayor expresión de los marcadores CD80, CD83 y CD86 (Células dendríticas maduras) en comparación con el grupo poliestireno tratado con LPS. Los niveles de expresión de los marcadores CD80, CD83 y CD86 también resultaban ser mayores en células dendríticas inmaduras cultivadas en quitosano sin estímulo de LPS al compararlas con sus semejantes en poliestireno. Con el fin de evaluar la funcionalidad de las células dendríticas, se midieron las concentraciones de IFN- γ secretado por linfocitos en co-cultivos con células dendríticas estimuladas con LPS que habían sido cultivadas en quitosano o poliestireno. Las células dendríticas fueron capaces de estimular a los linfocitos y se encontró que el co-cultivo con células dendríticas estimuladas con LPS precedente de la superficie de quitosano indujo una mayor producción de IFN- γ al compararlo con su semejante cultivado en poliestireno. Por último, la vacunación de células dendríticas estimuladas con el lisado tumoral que habían sido cultivadas en superficies de quitosano indujo una mayor actividad citotóxica de linfocitos T CD8⁺ (CD107a) y así una mayor actividad antitumoral (Yong-Chong Lin *et al.*, 2014).

Moffazal Jahromi y colaboradores investigaron el efecto de las nanopartículas de quitosano (nanopartículas de 175 nm) sobre la maduración y funcionalidad de células dendríticas

procedentes del bazo de ratones hembra BALB/c. Tras cultivarse las células dendríticas con 20 µg/ml de nanopartículas (18 horas a 37°C con 5% de CO₂), realizaron un análisis fenotípico mediante citometría de flujo de las siguientes moléculas; CD40, CD86 y MHC-II (Células dendríticas maduras) utilizando células dendríticas tratadas con CpG como control positivo y células sin tratar como control negativo. El análisis de citometría de flujo revela que las células dendríticas tratadas con las nanopartículas tuvieron mayores niveles de expresión de CD40, CD86 y MHC-II que el control negativo e incluso el control positivo. Este grupo de investigación también analizó la capacidad estimuladora de las células dendríticas maduras mediante una reacción mixta de linfocitos alogénicos. Tras realizar un co-cultivo entre las células dendríticas maduras (20 µg/ml) y células T alogénicas procedentes de los nódulos linfáticos de los ratones hembra C57BL/6 durante 4 días, se encontró un efecto proliferativo de las células T autólogas (Moffazal *et al.*, 2013). Lihui Jia y colaboradores evaluaron el efecto del quitosano (0.01mg/ml) sobre la morfología, fenotipo y funcionalidad de células dendríticas derivadas de medula ósea de ratón (C57BL/6). La maduración post-tratamiento con quitosano (cultivo con GM-CSF e IL-4 durante cuatro horas para una posterior discriminación con anti-CD11c acoplado a perlas magnéticas) fue evaluada mediante microscopia electrónica de transmisión (estructuras celulares), citometría de flujo (marcadores de superficie celular), ensayo de fagocitosis (FITC-dextran) y análisis de citocinas mediante ELISA. Se encontró que el tratamiento con quitosano indujo la disminución de fagosomas dentro de las células dendríticas derivadas de medula ósea, la sobreexpresión de las moléculas MHC-II, CD40, CD83 y CD86 (células dendríticas maduras) actividad fagocítica potenciada y altas concentraciones de IL-12 y TNF- α (Lihui Jia *et al.*, 2014).

4.3.2. Limitaciones de los biomateriales durante el cultivo de células.

- Problemas durante las evaluaciones post-tratamiento.

Durante la fase experimental de cultivos celulares con distintos biomateriales existen una serie de limitantes que dificultan el estudio. La estabilidad y degradación del biomaterial dependerán de sus propiedades físicas y químicas, las cuales a su vez dictan y dirigen el tipo de interacción que tendrán estos con las células. Trabajar con biomateriales los cuales posean propiedades físico-químicas inadecuadas ocasionara problemas al evaluar las

células post-tratamiento. La constante degradación de una película polimérica así como también la formación de agregados en sistemas nanoparticulados representan problemas al evaluar el fenotipo de las células mediante citometría de flujo. Pueden presentarse obstrucciones del sistema de fluidos durante la adquisición de eventos, obligando a lavar las muestras en más de una ocasión afectando gradualmente la viabilidad celular.

- Contaminaciones durante el cultivo celular.

Durante el cultivo celular pueden presentarse contaminaciones de naturaleza bacteriana y micótica. En muchas ocasiones los biomateriales se contaminan durante su fase de síntesis debido a que estos se fabrican en condiciones de esterilidad limitadas. Debido a lo anterior muchos centros de investigación poseen unidades exclusivas para estos procesos, las cuales se encuentran alejadas de otras áreas potencialmente contaminantes (unidades de bacteriología u hongos). La estandarización del proceso de síntesis debe asegurar la correcta esterilización del biomaterial si se pretende utilizar con fines biológicos.

4.4. Nanopartículas de quitosano como inductor de diferenciación.

4.4.1. Producción de quitosano y sus propiedades físico-químicas.

La quitina es el segundo polímero más abundante en la tierra, sobrepasado tan solo por la celulosa (Sastoque *et al.*, 2007). Actualmente este polímero se obtiene del exosqueleto de crustáceos procesados tales como langostas, cangrejos y camarones (Mármol *et al.*, 2011). Este polímero confiere propiedades de resistencia y soporte al exoesqueleto de muchos organismos de los cuales proviene. La quitina con alto grado de pureza se describe como un polvo cristalino el cual no posee olor ni sabor. Químicamente es nombrado como 2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucosa unido por enlaces β (1 \rightarrow 4) y su estructura química asemeja a la celulosa, siendo el grupo funcional en el carbono número dos (grupo funcional hidroxilo) la principal diferencia (Marguerite Rinaudo, 2006). Este biopolímero lineal es altamente insoluble en agua, propiedad que limita sus aplicaciones. Esta molécula es soluble en ácidos concentrados, en algunos fluoroalcoholes y soluciones al 5% de cloruro de litio, lo que la hace poco práctico para su aplicación y presenta baja reactividad (Mármol *et al.*, 2011).

Otras propiedades relevantes de este biopolímero son su alto peso molecular y estructura porosa que favorece su elevada absorción de agua (Ramírez Miguel *et al.*, 2010). Una vez que la quitina se obtiene de desperdicios marinos procedentes de zonas costeras, este se somete a un tratamiento alcalino a alta temperatura denominado desacetilación termoalcalina de la quitina. Este proceso involucra el uso de hidróxido de sodio a 120°C durante una a tres horas con la finalidad de remover proteínas y carbonato de calcio. Al final del proceso se obtienen moléculas con distintos grados de desacetilación (Marguerite Rinaudo, 2006).

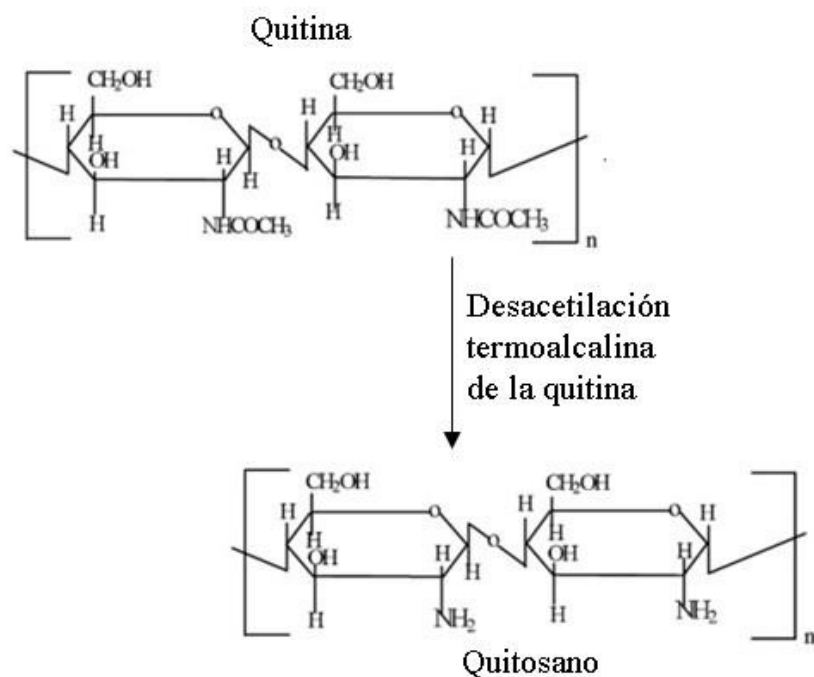


Figura 7. Reacción de desacetilación termoalcalina de la quitina (Miranda and Lizárraga, 2012).

La desacetilación termoalcalina se base en la remoción de grupos acetilos (unidos a radicales amino en la posición número dos de la molécula de quitina) mediante hidrólisis química en soluciones alcalinas a elevadas temperaturas. Cuando la fracción de grupos amino acetilados se reduce entre 40 al 35% el polímero resultante se denomina quitosano. Esta es la forma N-desacetilada de la quitina, una modificación de la quitina que posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad (Rejene *et al.*, 2009).

El quitosano se ha descrito como un polímero catiónico lineal, biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable. El carácter policatiónico del quitosano le confiere alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica (Goycoolea, 2009). Este polímero es biocompatible, biodegradable, no es tóxico y posee buenas propiedades de absorción. Las propiedades del quitosano como biopolímero, le permiten ser un material adecuado para trabajarse en áreas de ingeniería de tejidos o de manufactura de parches cicatrizantes (Majeti and Kumar, 2000).

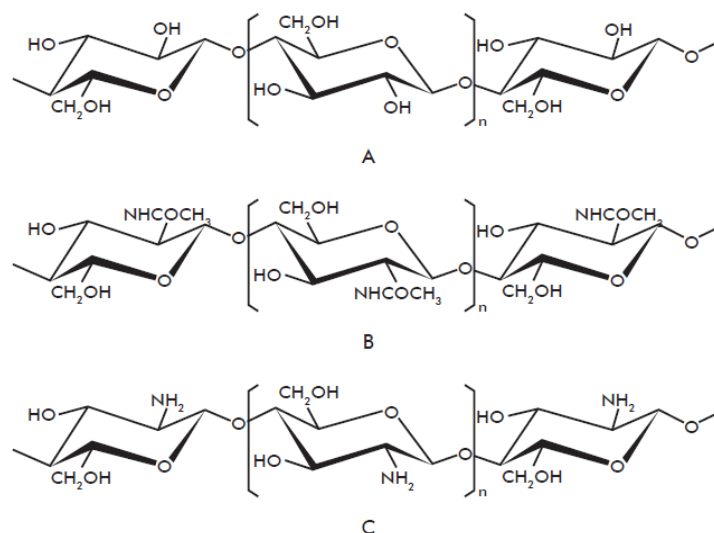


Figura 8. Estructura química de la celulosa (A), quitina (B) y quitosano (C). (Santiago de Alvarenga, 2011).

La naturaleza del proceso de desacetilación alcalina ha permitido a la industria obtener quitosano con distintos grados de desacetilación. El grado de desacetilación es un parámetro que define la solubilidad de la molécula de quitosano. A diferencia de la quitina, el quitosano es soluble en soluciones con pH menor a 6 a concentraciones de 1% y 0.1M. Esta propiedad permite que el quitosano sea preparado como una película fina de densidad y estructura de poro específica, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suave. Su grado de desacetilación (DD) varía desde un 60% hasta un 90% y los pesos moleculares (MW), se reportan de 50 hasta 2000 KDa, atribuyéndose esta heterogeneidad a la falta de control durante el procesamiento (Ramírez *et al.*, 2002).

La mayor fuente de quitina para la industria reside en los desperdicios marinos procedentes de la industria alimentaria. Muchas plantas procesadoras de alimentos, particularmente aquellas especializadas en enlatados, toman ventaja de sus desperdicios para generar quitosano. Aunque esta práctica es común en países como Estados Unidos y Japón, aún hay países que no explotan estos recursos lo cual genera acumulación de material orgánico en zonas costeras. Noruega y México son algunos países que tienen grandes fuentes de desperdicio crustáceo no explotado y poco interés en reutilizarlo con fines industriales. (Prabu and Natarajan, 2012).

Para estimar el costo de producir quitosano (1 kg) a partir de cascara de camarón, las siguientes etapas describen el material y trabajo involucrado. 1)- Transportación de residuos marinos desde su sitio de origen hasta las plantas procesadoras. 2)- Estandarización del proceso de desacetilación termoalcalina y el equipo apropiado para valorar el producto final. 3)- Suministros necesarios en el proceso como lo es; agua procesada (0.5t), agua a 4°C (0.9t), HCl (6.3 Kg) y NaOH (1.8 Kg). Factores como la relativa facilidad para adquirir desperdicios marinos, la sencillez del método de desacetilación termoalcalina y lo económico de los reactivos involucrados en la misma mantienen en el mercado al quitosano como reactivo comercial con precios competitivos y de fácil adquisición. Actualmente en el mercado se puede conseguir quitosano comercial (50g) por un precio menor a 60 dólares (Prabu and Natarajan, 2012).

Producto	Compañía	Presentación	Costo (M.N.)	Revisión
Qts. (LMW)	Sigma-aldrich	50g	1,089.00	Enero 2016
Qts. (LMW)	Sigma-aldrich	250g	3,764.00	Enero 2016
Qts. (MMW)	Sigma-aldrich	50g	1,177.00	Enero 2016
Qts. (MMW)	Sigma-aldrich	250g	4,600.00	Enero 2016
Qts. (HMW)	Sigma-aldrich	50g	1,332.00	Enero 2016

Tabla 3. Precios actuales en el mercado de distintas presentaciones de quitosano. (Sigma-Aldrich, 2016).

4.4.2. Nanotecnología y aplicaciones actuales de las nanopartículas.

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a escala nanométrica. Uno de los campos de estudio que abarca la nanotecnología es el de las nanopartículas poliméricas. En los últimos años este campo se ha extendido rápidamente y en la actualidad juega un papel importante en una amplia gama de áreas que van desde la electrónica, fotónica, conducción de materiales, sensores, medicina, biotecnología, control de contaminación y medioambiente (Schmid, 2004). Las nanopartículas se definen como sistemas sólidos coloidales cuyo tamaño de partícula oscila entre 10 nm a 1 μ M. Si se les compara con partículas de tamaño micrométrico, estas tienen mayor desplazamiento debido a su tamaño y pueden ser incorporadas a las células con mayor facilidad (Singh and Lillard, 2009). Estos sistemas pueden contener principios activos disueltos, atrapados, encapsulados y/o adsorbidos en el seno de su matriz, permitiendo que estos funcionen entonces como vehículos acarreadores de genes (Murillo *et al.*, 2001). Dentro de las ventajas que poseen estos sistemas poliméricos se encuentran; incremento de la estabilidad de cualquier agente farmacológico volátil, ofrecen una mejora significativa sobre los métodos tradicionales orales e intravenosos en términos de eficiencia y efectividad, permiten entregar altas concentraciones de fármaco en tejidos y órganos específicos, funcionan como agentes de contraste en imagenología médica, pueden modificarse fácilmente sus propiedades de liberación así como su tamaño en general (Abhilash, 2010).

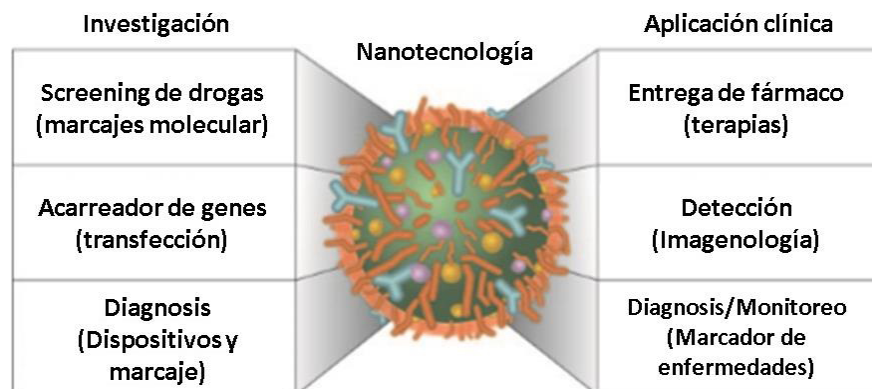


Figura 9. Aplicaciones de las nanopartículas en el área de la salud. (McNeil, 2005).

4.4.3. Biología de las nanopartículas y su interacción con células.

Las membranas celulares tienden a ser impermeables a muchas partículas de gran tamaño (Smith and Helenius, 2009) sin embargo, aquellas de menor tamaño (10-30nm) suelen atravesarla por procesos de difusión (Lead, 2009). Esta estructura celular actúa como una barrera que aísla el contenido citoplasmático interno de la célula del ambiente externo y dirige así las sustancias que deben entrar y salir. Uno de los mecanismos que permite superar esta barrera celular es la endocitosis. Este mecanismo es ampliamente explotado por virus (Poranen, 2009), los cuales se han convertido en una valiosa herramienta para el estudio de este proceso. La endocitosis y la difusión han sido propuestos como mecanismo que permiten incorporar nanopartículas de tamaño similar a los virus hacia el interior de las células (He *et al.*, 2010).

La endocitosis es el mecanismo por el cual la célula puede interiorizar proteínas y nutrientes mediante la prolongación de su membrana y consecuente invaginación del material exógeno hacia el espacio citosólico. Este mecanismo es utilizado por las células para eliminar residuos celulares y material innecesario de su interior. Existen diferentes tipos de endocitosis dependiendo de la sustancia que se busque interiorizar (Katja Kettler *et al.*, 2014).

Las partículas opsonizadas y pequeños volúmenes de soluto son internalizados por un mecanismo denominado fagocitosis (Mercer and Helenius, 2009). Las opsoninas son pequeñas moléculas (Ejemplo: anticuerpos) que favorecen la unión en el proceso de fagocitosis (Rus *et al.*, 2005). Por otra parte, las partículas en grandes cantidades de soluto son internalizadas por otro mecanismo denominado como pinocitosis. Este proceso de pinocitosis puede dividirse a su vez en macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores (Chithrani *et al.*, 2007).

Las células fagocíticas se encuentran en una gran variedad de organismos, desde aquellos complejos hasta los unicelulares, en estos últimos representa su principal fuente de nutrición (Cosson and Soldati *et al.*, 2008). En los animales, la fagocitosis es un mecanismo inmunológico de defensa restringido a células específicas, como macrófagos, monocitos y neutrófilos. La fagocitosis es un proceso inducido por ligandos en el cual se busca

incorporar y degradar materiales exógenos como bacterias y restos celulares con diámetros que van desde 0.5µM hasta 10µM. Además de la fagocitosis, las células fagocíticas pueden valerse de la pinocitosis. Este mecanismo es el responsable de que las células sean capaces de captar sustancias solubles y puede dividirse en diferentes procesos de acuerdo al tamaño de la vesícula y las proteínas involucradas en la formación vesicular (Katja Kettler *et al.*, 2014).

Las dimensiones máximas de las vesículas que se forman en cada ruta de internalización no se encuentran definidas del todo, sin embargo se especula que la principal limitante es estas es el tamaño de la carga que se pretende movilizar. (Patel *et al.*, 2007). El tamaño de las vesículas difiere entre especies animales y tipos celulares y este es proporcional al tamaño del material a incorporar en el citoplasma celular (Rejman *et al.*, 2004). De esta manera se presume que debe existir un límite de tamaño de nanopartícula a interiorizar.

Las partículas que poseen un tamaño cercano a los 200 nm no serán internalizadas por vía endocitosis mediada por clatrina y difícilmente por otras vías relacionadas con la endocitosis (Patel *et al.*, 2007).

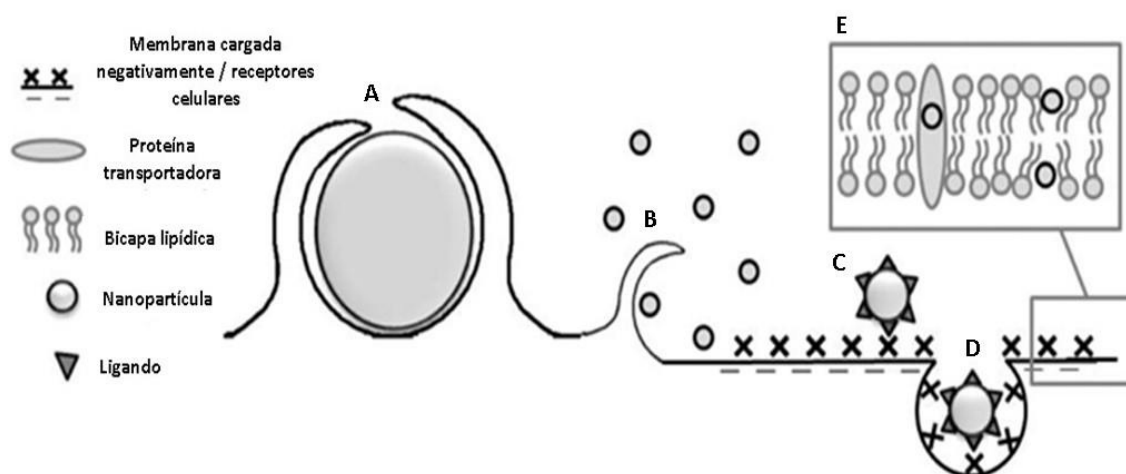


Figura 10. Mecanismos celulares de incorporación de nanopartículas por las células.

A) Incorporación de partículas de gran tamaño por fagocitosis. B) Incorporación de sustancias solubles por macropinocitosis. C) Unión específicas de ligados con receptores en la superficie de las células y consecuente endocitosis mediada por receptores (D). Difusión de nanopartículas a través de la membrana lipídica celular y canales proteicos (Katja Kettler *et al.*, 2014).

Las dimensiones máximas de las vesículas que se forman en cada ruta de internalización no se encuentran definidas del todo, sin embargo se especula que la principal limitante es estas es el tamaño de la carga que se pretende movilizar. (Patel *et al.*, 2007). El tamaño de las vesículas difiere entre especies animales y tipos celulares y este es proporcional al tamaño del material a incorporar en el citoplasma celular (Rejman *et al.*, 2004). De esta manera se presume que debe existir un límite de tamaño de nanopartícula a interiorizar. Las partículas que poseen un tamaño cercano a los 200 nm no serán internalizadas por vía endocitosis mediada por clatrina y difícilmente por otras vías relacionadas con la endocitosis (Patel *et al.*, 2007).

La micropinocitosis es un proceso constitutivo que ocurre continua e independiente de las necesidades celulares en regiones altamente corrugadas de la membrana plasmática. Durante este evento, la membrana adopta una conformación que permite envolver solutos e incorporarlos hacia el interior de la célula. Este mecanismo también se conoce como micropinocitosis adsorptiva (Katja Kettler *et al.*, 2014) y en él se forman vesículas con un tamaño de entre 100nm a 5 μ m (Hirota and Terada, 2012).

La endocitosis mediada por receptores es muy estudiada en la actualidad y juega un papel importante en el estudio de la incorporación de nanopartículas por células no fagocíticas. Este proceso permite que diferentes ligandos como toxinas, proteínas acarreadoras de colesterol, vitaminas, proteínas transportadoras de hierro así como hormonas y factores de crecimiento (Goldstein *et al.*, 1985) se adentren a las células mediante la unión de receptores específicos que se encuentran en la membrana celular (Conner and Schmid, 2003). La endocitosis mediada por receptores permite la incorporación de macromoléculas específicas del medio circundante. Por otra parte, es el mecanismo más explotado por virus para adentrarse a las células (glicoproteínas virales), sin dejar rastro alguno de su entrada en la membrana citoplasmática externa de la célula, evitando a la vez ser reconocidos por el sistema inmune (Smith and Helenius, 2009). Para ser capaces de adentrarse a las células, los virus primero se unen a la superficie de las células y se concentran en un punto específico de modo que inducen vías de señalización que controlen el proceso de endocitosis (Smith and Helenius, 2009). La endocitosis mediada por clatrina, es un proceso mediado por receptores con vesículas que poseen un tamaño aproximado de 120nm

(Conner and Schmid, 2003). La endocitosis mediada por caveolas es un proceso dirigido por receptores con vesículas de tamaño aproximado a 80nm en tamaño (Hirota and Terada, 2012). Existen también un proceso de endocitosis independiente de clatrina y caveolas que involucran vesículas con un tamaño aproximado de 50 nm (Katja Kettler *et al.*, 2014).

Otro factor que determina la inducción de alguna vía de incorporación con respecto a otra es el tamaño del material a incorporarse (Mercer and Helenius, 2009). En el caso de las partículas, la tasa de endocitosis mediada por receptores es determinada por el grado de interacción entre moléculas, disminución de la energía libre necesaria para acarrear moléculas hacia el interior celular, la cantidad de sitios de unión disponibles y el tiempo requerido por la membrana celular para envolver materiales exógenos (Gao *et al.*, 2005) . La incorporación de partículas por endocitosis es una compleja red de interacción entre numerosos parámetros como la energía liberada por el número de receptores unidos a su ligando, el número de vesículas que pueden ser formadas a partir de la membrana celular, el número de receptores que se difunden al interior celular junto con la partícula y el tiempo necesario para realizar el proceso anterior en su totalidad (Katja Kettler *et al.*, 2014).

En el caso de partículas más grandes, permitir que solo una partícula sea incorporada por vesícula, involucrara una unión numerosa de receptores al mismo tiempo y por ende un cambio contrastante en energía libre. Una mayor área de contacto con la membrana celular en el caso de nanopartículas de mayor diámetro con llevaran a una disminución en la energía libre, pero al mismo tiempo una menor cantidad de sitios de unión disponibles para otras partículas (Chithrani *et al.*, 2006). Este tipo de partículas por su naturaleza requerirán un mayor tiempo de exposición a la membrana celular para ser envueltas en su totalidad (Chithrani *et al.*, 2007).

4.4.4. Propiedades que influyen el comportamiento de nanopartículas.

La internalización de las nanopartículas por parte de las células y su comportamiento en sistemas biológicos es influenciada por un gran número de propiedades físicas y químicas específicas del sistema (Katja Kettler *et al.*, 2014).

- Tamaño de partícula:

Las construcciones nanométrica son más pequeñas que las células humanas (10,000-20,000 nm en diámetro) y orgánulos celulares, y desemejante tamaño que distintas macromoléculas biológicas como enzimas y receptores celulares. Las nanopartículas con un tamaño menor a 20nm pueden transitar a través de barreras biológicas que limitan a los agentes terapéuticos a actuar en su sitio blanco. Las paredes de los vasos sanguíneos, la barrera hematoencefalica y el epitelio estomacal son algunas de estas. El tamaño de partícula es un parámetro vital para un sistema acarreador de fármacos. Este debe ser lo suficientemente pequeño (aproximadamente 200nm) para evitar la rápida filtración por el bazo. De la misma manera, para atravesar el hígado las partículas deben tener un tamaño lo bastante pequeño para atravesar este órgano (150-200 nm). El tamaño a escala nanométrica permite a las nanopartículas interactuar con biomoléculas en la superficie de las células y adentrarse a su espacio citoplasmático. La habilidad para interactuar con receptores celulares, ácidos nucleicos, factores de transcripción y proteínas involucradas en señalización celular (McNeil, 2005).

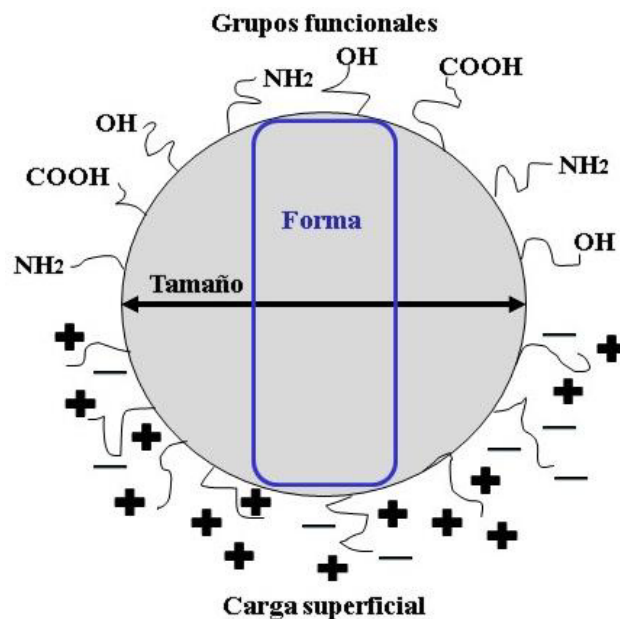


Figura 11. Parámetros físico-químicos determinantes entre la interacción de nanopartículas con células (Katja Kettler *et al.*, 2014).

- Carga superficial:

Se ha demostrado que aquellas nanopartículas con carga superficial cero ya sea por poseer grupos funcionales neutros (grupos hidroxilos) o ligandos zwiterionicos, poseen una baja eficiencia para ser interiorizados por las células en comparación con nanopartículas con carga (He *et al.*, 2010). Lo anterior se debe a que estas nanopartículas poseen baja afinidad para interactuar con las membranas celulares, las cuales en general poseen una carga negativa (Katja Kettler *et al.*, 2014).

La eficiencia de internalización de nanopartícula es mayor cuando estas poseen cargas superficiales positivas en células fagocíticas y no fagocíticas. (Lorenz *et al.*, 2006). Las cargas superficiales positivas (NH_2) incrementan la afinidad de las nanopartículas por la membrana celular y de esta manera la eficiencia de internalización es mayor en comparación con las nanopartículas de carga cero. La internalización está determinada por atracciones electrostáticas entre la membrana celular cargada negativamente y las nanopartículas (Jin *et al.*, 2009).

La carga superficial de la nanopartícula es un parámetro que determinara el grado de estabilidad del sistema. Una carga superficial alta previene la aglomeración de las nanopartículas y favorece la internalización de estas por parte de las células. Por otra parte, los sistemas con cargas superficiales bajas tienden a agregarse conforme transcurre el tiempo y su capacidad por ser interiorizadas por las células se ve disminuida (Zhao *et al.*, 2012). De esta manera se demuestra que la carga superficial es un parámetro que rige la capacidad de las nanopartículas para mantener su repulsión unas con respecto a las otras, no aumentar su tamaño (agregados) y ser entonces internalizadas (Katja Kettler *et al.*, 2014).

- Grupos funcionales de superficie:

Los grupos amino positivos ($-\text{NH}_2$) en la superficie de las nanopartículas tienden a otorgar cargas superficiales positivas. Se ha demostrado que la tasa de internalización de este tipo de nanopartículas ricas en este grupo funcional es muy alto tanto en células fagocíticas como en aquellas no fagocíticas (Alexis *et al.*, 2008). Los grupos funcionales carboxilos ($-\text{COOH}$) son los responsables de atribuir cargas negativas en la superficie de las

nanopartículas y se ha demostrado que la tasa de internalización de las nanopartículas que comparten esta característica es alta en células fagocíticas y no fagocíticas cultivadas con suero fetal bovino (Holzapfel *et al.*, 2006). Los grupos funcionales hidroxilo (-OH) son responsables de atribuir carga superficial neutra a las nanopartículas (He *et al.*, 2010).

4.4.5. Síntesis de nanopartículas de quitosano: gelación iónica.

Las nanopartículas a base de quitosano se forman como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente (Goycoolea, 2009). Uno de las metodologías más sencillas y utilizadas durante la elaboración de nano partículas de quitosano es la gelación iónica, la cual no implica equipo costoso para su elaboración (Calvo *et al.*, 1997). Entre las ventajas de este sistema cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza policationica del quitosano le confiere a estos sistemas la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación (Goycoolea, 2009).

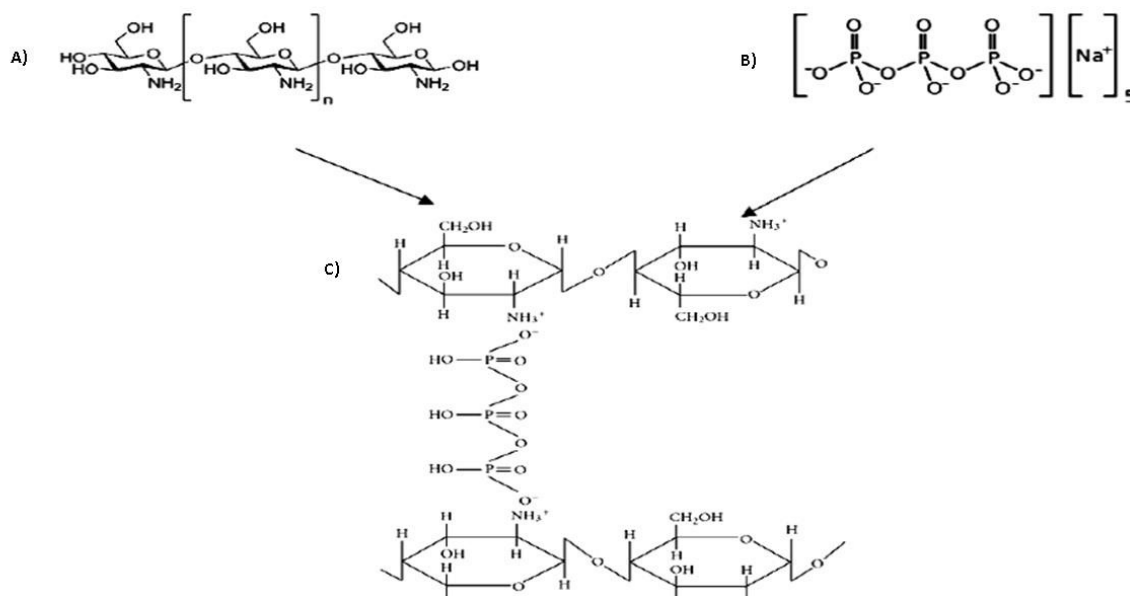


Figura 12. Gelación iónica. A) quitosano, B) tripolifosfato pentasódico, C) nanopartícula de quitosano (Ramkumar Ponnuraj *et al.*, 2015)

Este método fue inicialmente descrito por Calvo y colaboradores (Calvo *et al.*, 1997) para sintetizar nanopartículas de quitosano hidrofílicas mediante el fenómeno de gelación iónica. El método involucra una mezcla de dos fases acuosas, de las cuales una es el polímero quitosano y la otra es un polianión conocido como tripolifosfato de sodio. El mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas de quitosano-TPP plantea que la gelación iónica del quitosano ocurre por interacciones electrostáticas entre los productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$) con los grupos $-NH_3^+$ del quitosano (Calvo *et al.*, 1997).

El tamaño de nanopartícula de este sistema es muy sensible al pH y al potencial z de las nanopartículas, el cual es indicativo de su carga superficial (López *et al.*, 2005). El tamaño de partícula en este sistema se ha observado que varía en un rango de 100 a 350 nm: el potencial zeta entre +20 y +50 mV e invariablemente poseen una morfología esférica de acuerdo a evidencias de microscopía de transmisión y de fuerza atómica (Kim, 2006). Los coacervados son formados como resultado de la interacción electrostática entre las dos fases acuosas, donde la gelación iónica genera la transición de una fase líquida a un gel bajo condiciones de temperatura ambiente. Macroscópicamente se obtiene una solución de diversos grados de opalescencia dependiente de la concentración de quitosano y TPP así como de las condiciones de síntesis (Nagavarma *et al.*, 2012).

5. Hipótesis

Las nanopartículas de quitosano inducen la diferenciación de monocitos humanos hacia células dendríticas.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general:

Determinar si las nanopartículas de quitosano tienen el potencial de generar células dendríticas y correceptores relacionados a su fenotipo.

6.2. Objetivos específicos:

1. Caracterización físico-química de nanopartículas de quitosano sintetizadas.
2. Determinar la concentración de endotoxina presente en las nanopartículas de quitosano.
3. Determinar si las nanopartículas de quitosano inducen la expresión de los marcadores de superficie CD14, CD80, CD83 y HLA-II, relacionados con el proceso de diferenciación de células dendríticas.
4. Determinar la morfología y viabilidad de las células en el proceso de diferenciación inducido por las nanopartículas.
5. Determinar la capacidad fagocítica de las células diferenciadas con los tratamientos de nanopartículas.

7. Material y métodos.

7.1. Síntesis de nanopartículas de quitosano.

Se preparó una solución de quitosano (1 mg/mL) utilizando ácido acético al 0.4M y se homogenizó por agitación magnética durante 20 minutos a 600 rpm. Esta solución se sonicó durante 20 minutos más a 25° C (BRANSON 2800). Después, la solución de quitosano se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm para sedimentar cualquier residuo de quitosano no disuelto. Finalmente se ajustó el pH de esta solución a 5.2 utilizando hidróxido de sodio al 1M. Como agente entrecruzante se utilizó tripolifosfato pentasódico disuelta en agua destilada (2mg/mL). La síntesis de nanopartículas de quitosano se llevó a cabo homogenizando constantemente la solución de quitosano a 7000 rpm durante 7 minutos mientras se goteo simultáneamente tripolifosfato pentasódico (2mg/mL). Al final del proceso se obtuvo una solución opalescente la cual fue incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se esterilizó durante 10 minutos con luz ultravioleta y se centrifugó a 5,000 rpm durante 1 hora a 20°C. Se descartó el sobrenadante y el material centrifugado se lavó con agua destilada (5000 rpm durante 1 hora). El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino y el contenido se sonicó durante 13 minutos a 25°C. Finalmente se determinó la concentración secando una alícuota de volumen conocido de la solución de nanopartículas por medio de diferencia de peso.

7.2. Caracterización de nanopartículas de quitosano.

7.2.1. Tamaño promedio de nanopartícula.

El tamaño promedio de nanopartícula se determinó mediante dispersión de luz dinámica. La muestra de nanopartículas se cargó en una celda capilar para espectrofotometría y se analizó a 25°C utilizando el equipo nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

7.2.2. Carga superficial de nanopartícula: potencial Z.

El potencial Z de las nanopartículas se determinó mediante electroforesis doppler con láser. La muestra de nanopartículas se cargó en una celda capilar acoplada a electrodos y se analizó a 25°C utilizando el equipo nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

7.2.3. Microscopía electrónica de barrido.

Las nanopartículas de quitosano se liofilizaron en un equipo LABCONCO® de 6 litros durante 16 horas. El liofilizado obtenido se montó de manera uniforme sobre una cintilla adhesiva de carbono acoplada a un porta muestras para SEM y se procedió a analizar utilizando el equipo NOVA NANOSEM 200 (FEI®) empleando 2 kV en modo de inmersión. El análisis de microscopía electrónica de barrido fue realizado en colaboración con el Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV) unidad Monterrey ubicado en el municipio de Apodaca, Nuevo León.

7.2.4. Espectroscopía de infrarrojo.

El liofilizado obtenido se mezcló con bromuro de potasio en un mortero (1:10) y se premo para obtenerse una pastilla la cual fue sometida a radiación infrarroja con el equipo Nicolet* 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific). El análisis de espectroscopia de infrarrojo fue realizado en colaboración con el Centro de innovación, investigación y desarrollo en ingeniería y tecnología de la facultad de ingeniería mecánica y eléctrica de la Universidad Autónoma de Nuevo León ubicado en el municipio de Apodaca, Nuevo León.

7.3. Detección de endotoxina bacteriana presente en nanopartículas.

Una vez sintetizadas las nanopartículas de quitosano, estas se resuspendieron en RPMI-1640 con 10% SFB y fueron sometidas a un ensayo de detección de toxinas bacterianas utilizando el kit comercial de lisado de amebocitos de limulus PYROGENT™. El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). En presencia de endotoxinas, ciertos factores presentes en el LAL se activan en una cascada proteolítica que produce la escisión de un sustrato peptídico y por consecuencia se obtiene el fenómeno de coagulación. Antes de evaluar las muestras, se preparó un control positivo de endotoxina de *E. coli* O111:B4. Para esto se reconstituyó el vial de endotoxina con 1 mL de agua libre de pirógenos (agua inyectable) y se agitó el vial con vortex por lo menos 15 minutos. Posterior a esto se diluyó la endotoxina a una concentración de 1 UE/mL con agua libre de pirógenos y se agitó en vortex durante 60 segundos. De la solución anterior, se prepararon las siguientes diluciones utilizando de igual manera agua inyectable: 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.

Se utilizó agua inyectable libre de pirógenos como control negativo del ensayo de endotoxina. De la muestra de nanopartículas se tomó 1 mL y a partir de este se realizaron una serie de diluciones (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16). Una vez realizadas las diluciones se depositaron 0.25 mL de cada dilución a un vial que contenía el lisado de *limulus* de amebocitos. Después de haber reconstituido los viales, estos se incubaron durante 60 minutos a 37°C en un baño de agua, al final del periodo de incubación, cuidadosamente se retiró cada vial del baño de agua y se invirtieron 90°. Se compararon los viales correspondientes a las muestras con los controles. Una prueba positiva se caracteriza por la formación de un gel sólido el cual permanece intacto después de la inversión, esto debe ser observado en el vial del control positivo. Una prueba negativa se caracteriza por la ausencia de un coágulo sólido después de la inversión. Este debe ser observado en el vial del control negativo (agua inyectable).

7.4. Establecimiento del cultivo primario de monocitos de sangre periférica.

Los monocitos utilizados en los ensayos de diferenciación celular se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica de sujetos sanos utilizando Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich®). Las muestras se adquirieron por punción venosa y se colectaron en tubos heparinizados. Una vez obtenida la sangre, esta se diluyó 1:1 con PBS 1X y se vertió cuidadosamente sobre una cama de Ficoll- Histpaque (20 ml) hasta tener un sistema constituido por dos fases (Sangre diluida 1:1 sobre Ficoll-Histopaque). Esta solución se centrifugó a 1600 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente para obtener un sistema multi-fases (Plasma: contiene plaquetas, Anillo blanco: contiene células mono nucleares de sangre periférica, Ficoll-Histopaque y eritrocitos en el fondo del tubo). Con ayuda de una micropipeta se tomó el anillo blanco teniendo cuidado de no mezclar las fases. Las células colectadas fueron sometidas a los siguientes lavados: 1) 1600 rpm durante 15 minutos a 25°C con PBS 1X, 2) 800 rpm durante 10 minutos a 25°C utilizando solución de lisis de eritrocitos y por ultimo 800 rpm durante 10 minutos a 25°C utilizando PBS. Una vez lavadas las células, se procedió a realizar un recuento de células utilizando el método de exclusión por azul tripan para así cultivar 4,000,000 de células por pozo en placas de poliestireno. Las placas se incubaron bajo las siguientes condiciones: 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante toda una noche con RPMI-1640 10% de suero fetal

bovino. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante rico en linfocitos y se sustituyó con un mismo volumen de medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino.

7.5. Grupos experimentales.

Los siguientes grupos experimentales se trabajaron: 1) monocitos tratados durante 7 días con RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino, 2) monocitos tratados durante 7 días con 0.30 mg/mL de nanopartículas de quitosano y por último, 3) monocitos tratados durante 7 días con 0.30mg/mL de nanopartículas de quitosano, a los cuales en el día 5 se adicionó antígeno (albúmina de pollo; 1mg/mL) y adyuvante (KLH; 20ng/mL).

7.6. Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas.

Tras siete días de incubación, se retiró completamente el medio de cultivo y las células parcialmente adheridas a la placa se colectaron. Las células recuperadas se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y después las células correspondientes a cada tratamiento se resuspendieron en un volumen de 100µL de PBS 1X. Finalmente se añadieron 2µL de cada anticuerpo (Anti-human CD14 APC-Cy7, Anti-human CD80 FITC, Anti-human CD83 PE y Anti-human HLA-II FITC) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X que contenía albumina al 0.5% e inmediatamente se analizaron las muestras por citometría de flujo (BD accuriTM C6).

7.7. Evaluación morfológica de monocitos tratados con nanopartículas.

Se trataron cubreobjetos de tamaño estándar para servir de soporte a las células en cultivo y montarlas en laminillas para su visualización microscópica. Los cubreobjetos se lavaron durante 1 minuto en las siguientes soluciones: solución detergente neutra, etanol al 70%, acetona y agua destilada. Tras los lavados, se dejaron reposar en agua destilada y se sometieron a un ciclo de sonicación durante 20 minutos. Finalmente se esterilizaron por calor seco a 250°C durante dos horas. Estos cubreobjetos se colocaron en placas de poliestireno de 6 pozos y se cultivaron los monocitos de sangre periférica sobre estos. Tras siete días de incubación, se retiró completamente el medio de cultivo y se adicionó un volumen suficiente de paraformaldehído al 4% para cubrir el pocillo de la placa en su totalidad y mantenerse de esa manera durante 10 minutos. Se lavaron los pocillos dos veces con PBS 1X y se colocaron los cubreobjetos sobre portaobjetos que contenían resina para

mantener la preparación. Finalmente se dejaron secar las preparaciones a 37°C. Las laminillas fueron observadas utilizando el microscopio invertido Olympus IX70.

7.8. Viabilidad celular de monocitos tratados con nanopartículas.

La viabilidad celular se analizó el séptimo día de cultivo utilizando el método de exclusión de yoduro de propidio mediante citometría de flujo. Las células correspondientes a cada tratamiento se lavaron dos veces PBS 1X (1200 rpm/ 10 minutos) y se resuspendieron en 100µL de PBS1X. Se añadió 1 µL de yoduro de propidio a cada muestra y se incubaron en oscuridad durante 1 minuto. Finalmente se procedió a analizar las muestras utilizando el equipo (BD accuriTM C6).

7.9. Capacidad fagocítica de monocitos tratados con nanopartículas.

Tras siete días de incubación, las células se lavaron con PBS 1X (1200 rpm/ 10 minutos). Las células se colectaron en tubos eppendorf y se lavaron con RPMI sin suero fetal bovino (1200 rpm/ 10 minutos). Se adicionó 1 mL de la solución de FITC-dextran (1 mg/mL) a cada una de las muestras y se incubaron durante 6 horas a 37°C. Como controles internos de la prueba de fagocitosis se incubaron células con FITC-dextran a 4°C (inhibición de la capacidad fagocítica) y a 37°C (no inhibición de la capacidad fagocítica). Finalmente los tubos se centrifugaron (1200 rpm/ 10 minutos) y las células se lavaron dos veces con PBS 1X que contenía albumina al 0.5%. Se procedió a analizar las muestras mediante citometría de flujo utilizando el equipo (BD accuriTM C6).

7.10. Análisis estadísticos.

Las variables evaluadas se presentan como el promedio \pm la desviación estándar y la diferencia entre los tratamientos y el control se evaluó realizando un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey ($p < 0.05$). Se utilizó el software GraphPad Prism versión 5 para graficar los resultados y realizar los estadísticos.

8. Resultados.

8.1. Tamaño promedio de nanopartícula mediante dispersión de luz dinámica.

El análisis de dispersión de luz dinámica realizado a las nanopartículas de quitosano muestra una distribución unimodal de nanopartículas cuyo tamaño promedio es de 208 nm. El índice de polidispersidad obtenido fue de 0.181. No se registraron otras distribuciones de distintos tamaños (Figura 13).

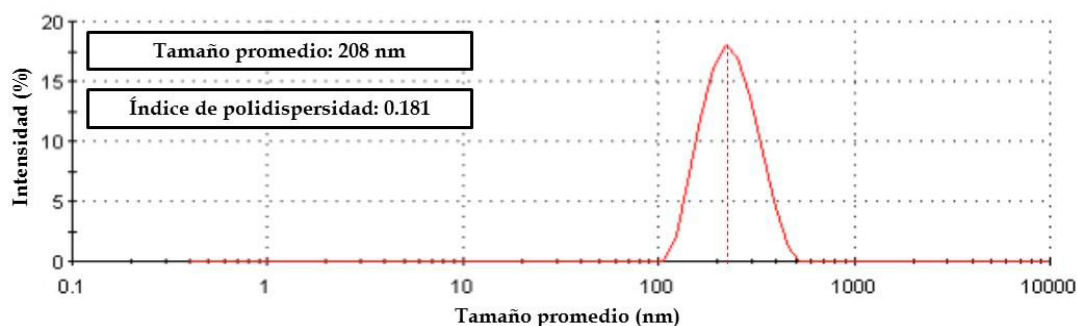


Figura 13. Análisis de tamaño promedio de partícula mediante dispersión de luz dinámica.

Se realizaron lavados con agua destilada a 5000 rpm durante 1 hora para eliminar el ácido acético requerido durante el proceso de gelación iónica. Las nanopartículas redispersadas se cargaron en una celda capilar de espectrofotometría y se analizaron utilizando el equipo Nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

8.2. Análisis de carga superficial de nanopartícula de quitosano (potencial Z).

El análisis de carga superficial realizado a las nanopartículas sintetizadas mediante gelación iónica demostró su naturaleza catiónica con +24.7 mV de potencial Z (Figura 14).

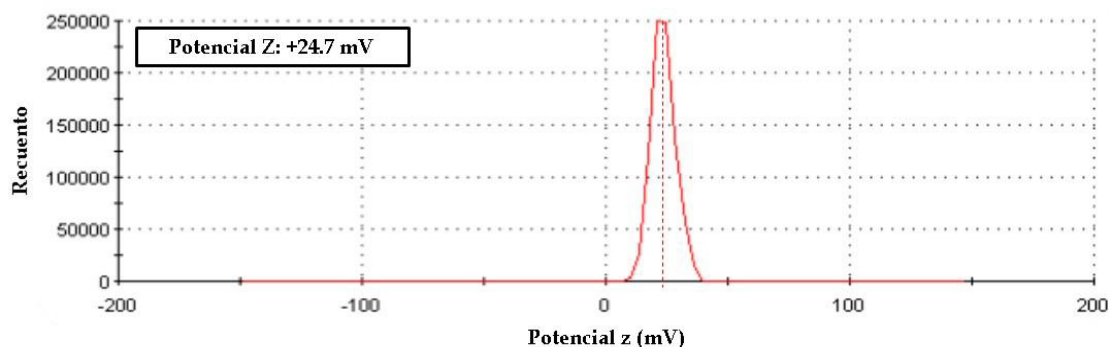


Figura 14. Análisis de potencial z de partícula mediante electroforesis doppler con láser.

Se realizaron lavados con agua destilada a 5000 rpm durante 1 hora para eliminar el ácido acético requerido durante el proceso de gelación iónica. Las nanopartículas redispersadas se cargaron en una celda capilar acoplada a electrodos y se analizaron con el equipo Nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

8.3. Morfología de nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido.

La micrografía electrónica de barrido obtenida de las nanopartículas de quitosano sintetizadas demuestra la presencia de partículas de superficie lisa y morfología semiesférica a irregular distribuidas de manera uniforme (Figura 15).

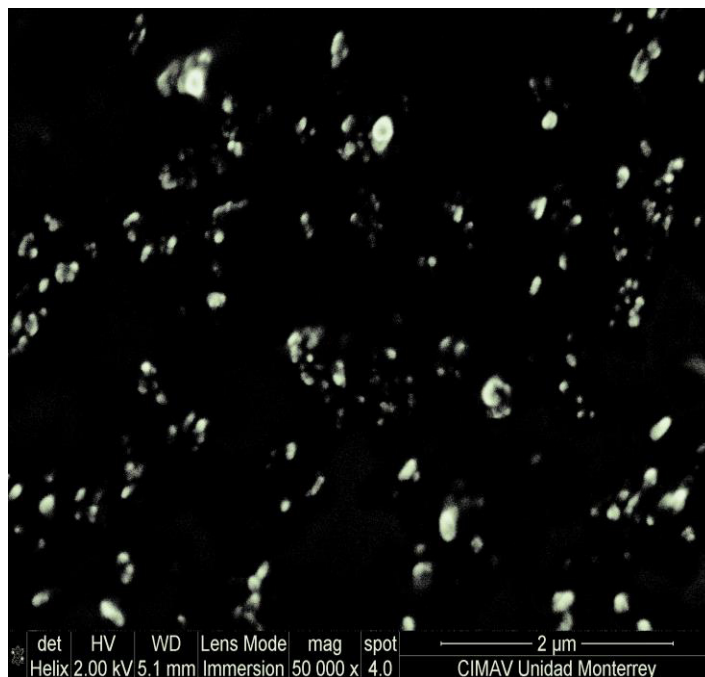


Figura 15. Análisis morfológico de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido.

Las nanopartículas de quitosano sintetizadas fueron liofilizadas durante 16 horas en un equipo de seis litros (LABCONCO®). El liofilizado obtenido se distribuyó de manera uniforme sobre una cinta adhesiva de carbono acoplada a un porta muestras para microscopía electrónica de barrido y se procedió a analizar utilizando el equipo NOVA NANOSEM 200 (FEI®).

8.4. Análisis de formación de partícula mediante espectroscopia de infrarrojo.

El proceso de formación de nanopartícula (gelación iónica) fue evaluado mediante espectroscopia de infrarrojo, comparando el espectro de infrarrojo del quitosano comercial contra el de las nanopartículas de quitosano. Las figuras 16B y 16C muestran las bandas de absorción infrarroja propias del quitosano comercial y de las nanopartículas de quitosano, respectivamente. Las bandas de absorción anchas e intensas presentes a los 3206 cm^{-1} (Figura 16B) y 3088 cm^{-1} (Figura 16C) corresponden a la vibración de estiramiento del enlace O-H. Por otra parte, las bandas obtenidas a los 2880 cm^{-1} (Figura 16B) y 2888 cm^{-1} (Figura 16C) corresponden a la vibración de estiramiento del enlace C-H.

Las bandas de absorción correspondientes a las vibraciones de estiramiento de la amida primaria (Figura 16C; 1644 cm^{-1}) y amida secundaria (Figura 16C; 1556 cm^{-1}) de la muestra de nanopartículas de quitosano presentaron un desplazamiento con respecto a los mismos grupos funcionales de la muestra de quitosano comercial (Figura 16B; 1632 cm^{-1} y 1536 cm^{-1} respectivamente). La muestra de nanopartículas de quitosano presentó una banda de absorción característica de la vibración generada entre un grupo P-O, esta banda de absorción está ausente en el espectro de infrarrojo del quitosano puro y demuestra que existe una interacción entre el grupo amino y el grupo fosfato (Figura 16C; 1225 cm^{-1}).

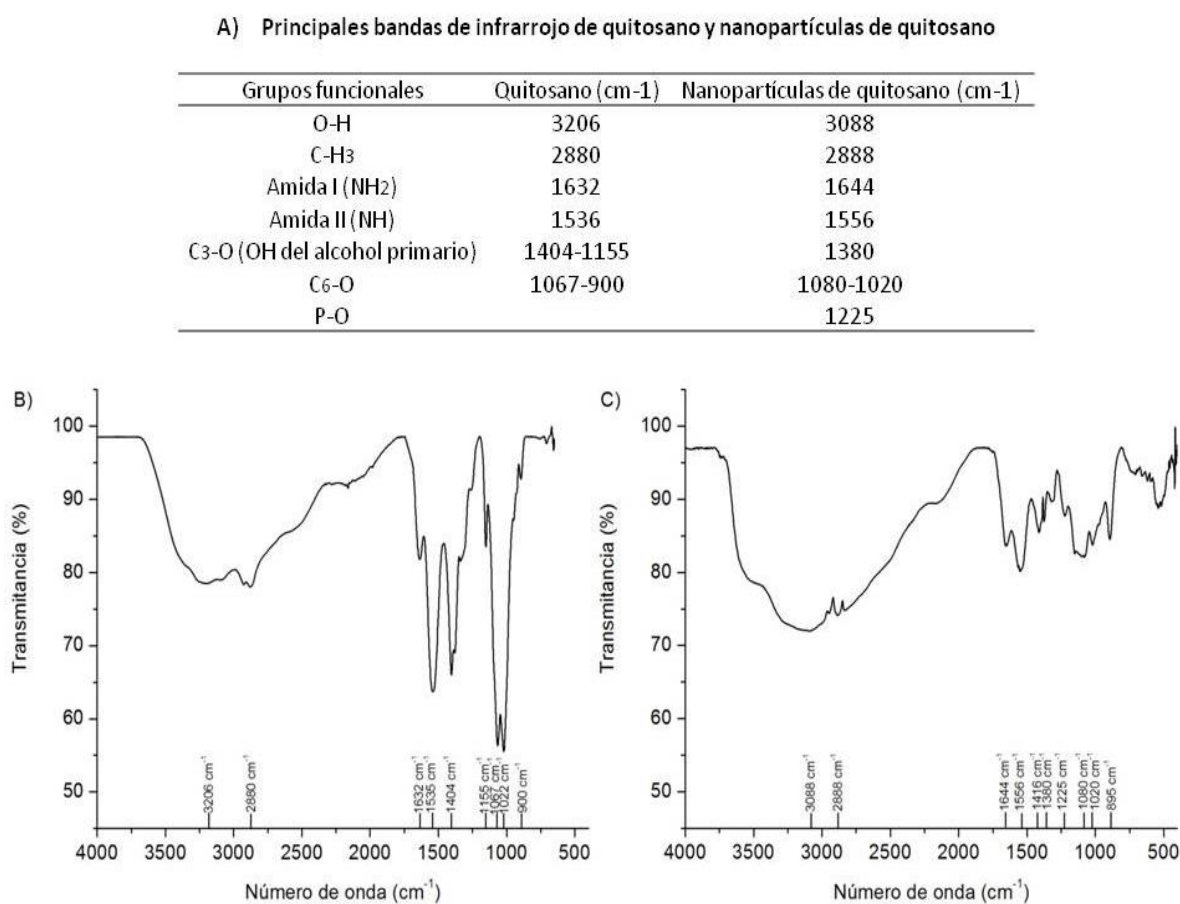


Figura 16. Grupos funcionales de nanopartículas mediante espectroscopia de infrarrojo.

Las nanopartículas de quitosano sintetizadas fueron liofilizadas durante 16 horas en un equipo de seis litros (LABCONCO®). El liofilizado obtenido se mezcló con bromuro de potasio en un mortero de cuarzo y se presionó para obtenerse una película fina la cual fue sometida a radiación infrarroja. A) Resumen de las principales bandas de infrarrojo de quitosano comercial y nanopartículas de quitosano obtenidas. B) Espectro de infrarrojo del quitosano comercial. C) Espectro de infrarrojo de nanopartículas de quitosano.

8.5. Determinación de lipopolisacárido.

El proceso de síntesis de nanopartículas de quitosano fue sometido a una determinación de lipopolisacáridos por el método del lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus*, encontrando que ninguno de los productos evaluados mostró el fenómeno de coagulación, indicando con esto que las nanopartículas se encuentran libres de lipopolisacárido a un nivel de detección determinado. No se encontraron niveles de endotoxina detectables en las muestras de nanopartículas analizadas, lo cual indica que la concentración de lipopolisacárido fue menor a 0.05 UE/mL (Figura 17).












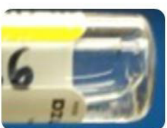
Concentración de endotoxina / dilución: control positivo	Control positivo	Control negativo	Nanopartículas
0.5 UE/mL (Dilución 1:2)	 (+)	 (-)	 (-)
0.25 UE/mL (Dilución 1:4)	 (+)	 (-)	 (-)
0.125 UE/mL (Dilución 1:8)	 (+)	 (-)	 (-)
0.06 UE/mL (Dilución 1:16)	 (+)	 (-)	 (-)

Figura 17. Detección de endotoxina bacteriana presente en muestras de nanopartículas de quitosano.

Los liofilizados contenidos en los viales del ensayo de *limulus* de amebocitos fueron reconstituidos con nanopartículas de quitosano resuspendidas en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino. Control positivo: endotoxina de *E. coli* O111:B4. Control negativo: agua inyectable libre de pirógenos. Los signos entre paréntesis hacen referencia a la presencia o ausencia de coágulo. La detección de endotoxina se realizó por triplicado.

8.6. Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.

Los tratamientos con nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno y hemocianina fueron capaces de incrementar el porcentaje de los marcadores fenotípicos celulares CD14 (96% y 98.6%), CD80 (38.3% y 66.3%), CD83 (57.5% y 90.66%) y HLA-II (53.66% y 78%) respectivamente y de manera significativa ($p<0.05\%$) al compararse con el control (células cultivadas en RPMI con 10% de SFB). No se encontró diferencia significativa ($p<0.05\%$) entre los tratamientos de nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano combinado con albumina de pollo y hemocianina con respecto al porcentaje de expresión de CD14 (Figura 18).

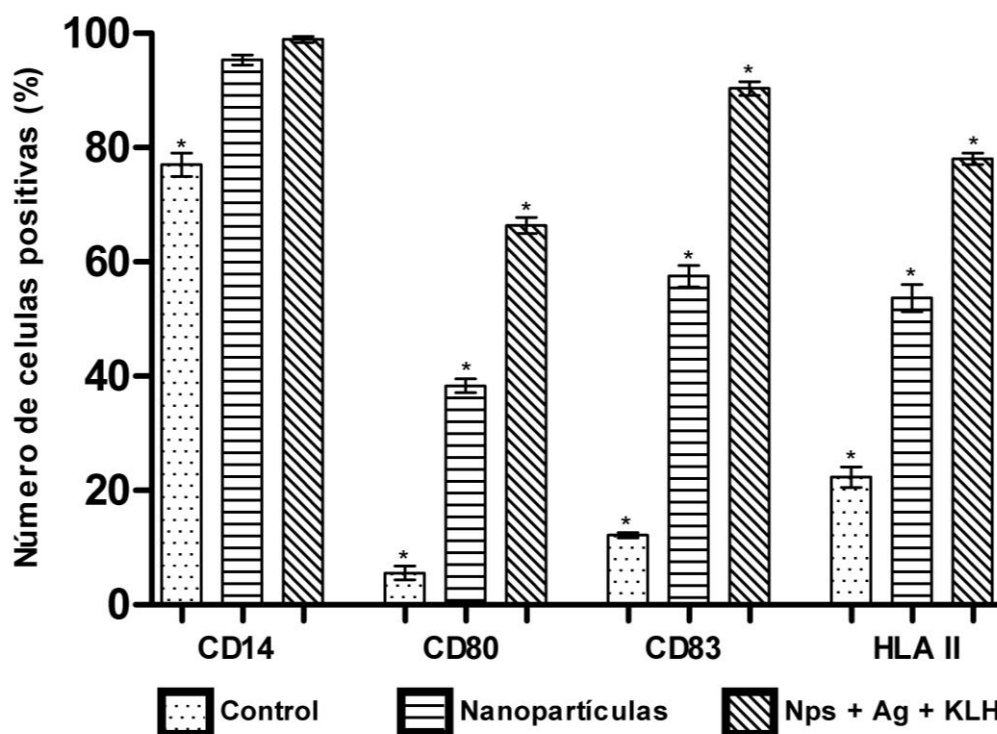


Figura 18. Análisis fenotípico de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.

Se cultivaron monocitos de sangre periférica durante 7 días en presencia de nanopartículas de quitosano (0.30 mg/mL) y nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno (albumina de pollo: 1mg/mL) y hemocianina (KLH: 10 ng/mL). Control: células cultivadas con RPMI-1640 con 10% de SFB durante 7 días. Las variables evaluadas se presentan como el promedio \pm la desviación estándar y la diferencia entre los grupos se evaluó realizando una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey ($p<0.05$). Los asteriscos (*) señalan que existe diferencia significativa entre las variables de cada grupo.

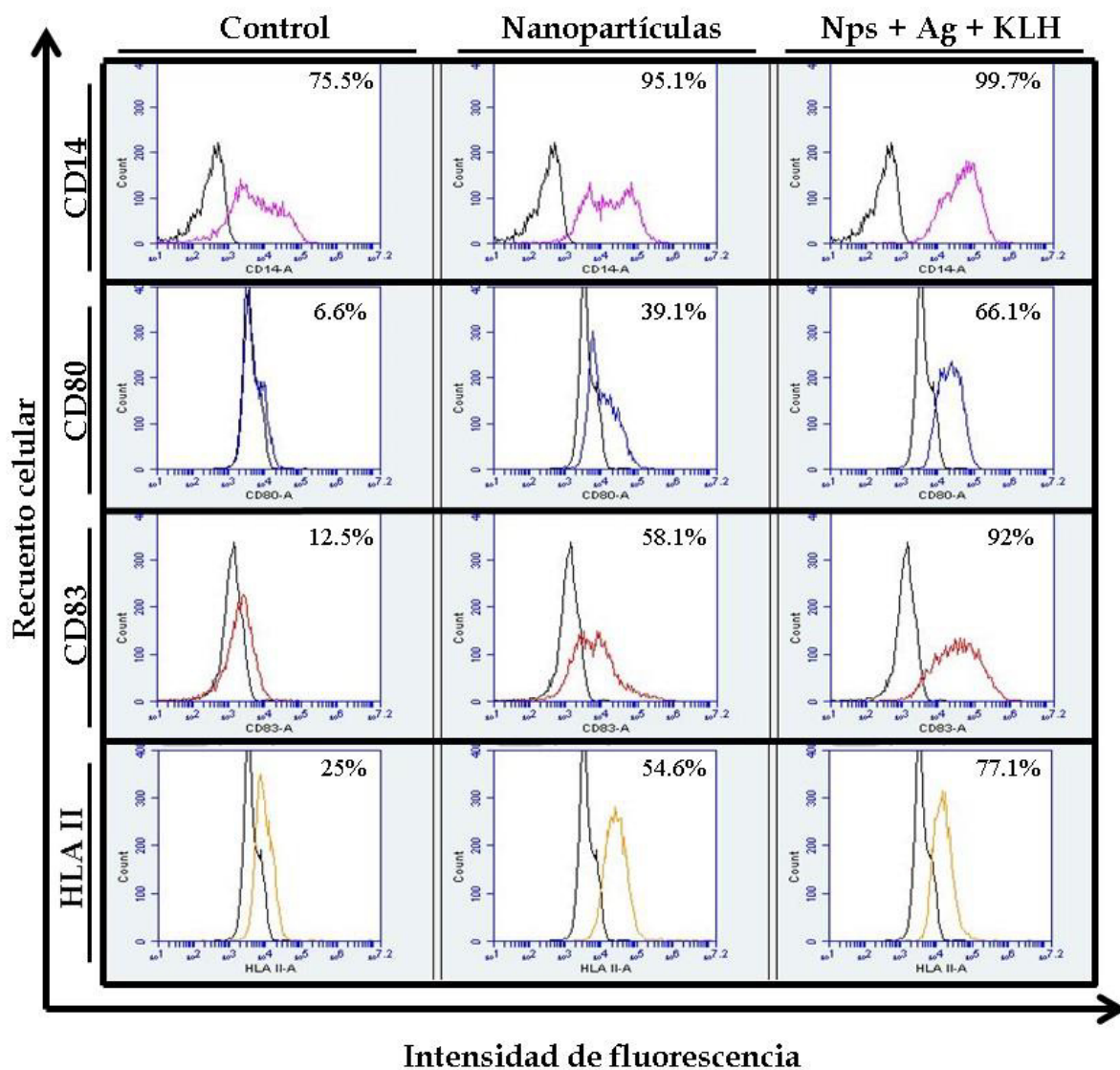


Figura 19. Histogramas de citometría de flujo representativos del análisis fenotípico celular. Se cultivaron monocitos de sangre periférica durante 7 días en presencia de nanopartículas de quitosano (0.30 mg/mL) y nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno (albumina de pollo: 1mg/mL) y hemocianina (KLH: 10 ng/mL). Control: células cultivadas con RPMI-1640 con 10% de SFB durante 7 días. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos para citometría de flujo: anti-human CD14 APC-Cy7 (histograma color rosa), anti-human CD80 FITC (histograma color azul), anti-human CD83 PE (histograma color rojo) y anti-human HLA II FITC (histograma color naranja). Los histogramas color negro representan la autofluorescencia de las células. Los resultados mostrados corresponden a uno de tres experimentos individuales

8.7. Viabilidad celular y morfología de monocitos humanos tratados con nanopartículas.

Las células tratadas con nanopartículas de quitosano y nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno y hemocianina mostraron una viabilidad celular de 67% y 61% respectivamente en su séptimo día de cultivo. Solo el tratamiento de nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno y hemocianina mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a el control (Figura 20A). Los tratamientos con nanopartículas de quitosano o nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno y hemocianina fueron capaces de inducir el desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas en las células tratadas al compararse con el control. (Figura 20B).

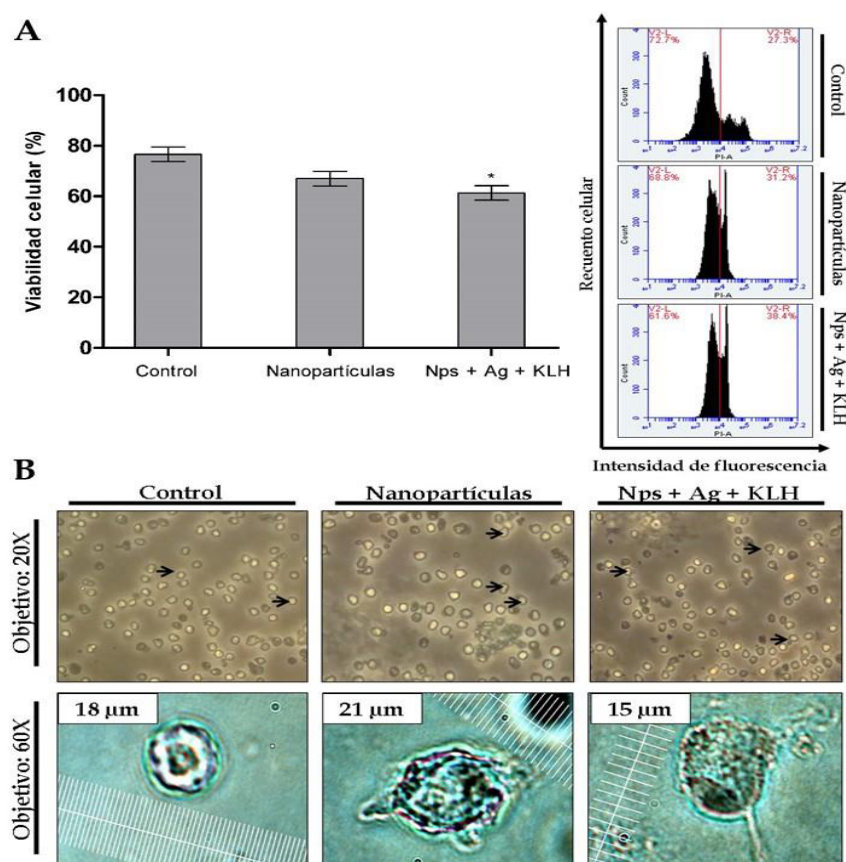


Figura 20. Viabilidad y morfología de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.

Se cultivaron monocitos de sangre periférica durante 7 días en presencia de nanopartículas de quitosano (0.30 mg/mL) y nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno (albumina de pollo: 1mg/mL) y hemocianina (KLH: 10 ng/mL). Control: células cultivadas con RPMI-1640 con 10% de SFB durante 7 días. A) La viabilidad celular se analizó utilizando yoduro de propidio. Los asteriscos señalan que existe diferencia significativa al compararse con el control (Tukey, $p < 0.05$). B) El análisis morfológico celular (20X) se realizó en fresco el séptimo día del cultivo, por otra parte para el análisis utilizando el objetivo 60X, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se observaron utilizando el microscopio invertido Olympus IX70.

8.8. Capacidad fagocítica de monocitos humanos tratados con nanopartículas.

El tratamiento de nanopartículas de quitosano (21% de células positivas) fue capaz de incrementar el proceso de fagocitosis de manera significativa ($p < 0.05\%$) al compararse con el control (9% de células positivas). No se encontró diferencia significativa ($p < 0.05\%$) entre los tratamientos de nanopartículas de quitosano o nanopartículas de quitosano combinado con albumina de pollo y hemocianina con respecto a la capacidad de incorporar FITC-dextran. Los tres grupos experimentales tienen la capacidad de incorporar FITC-dextran a distintos niveles (Figura 21).

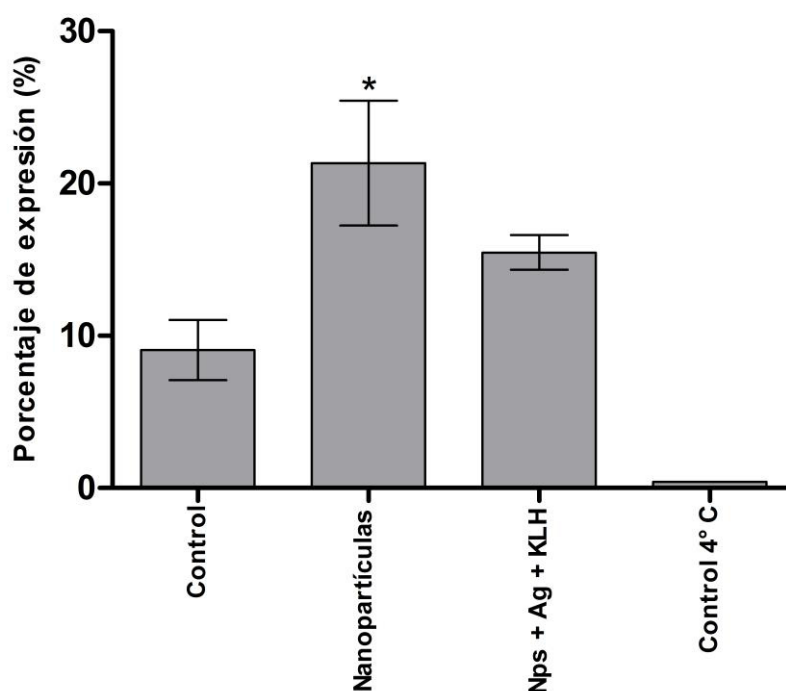


Figura 21. Capacidad fagocítica de monocitos tratados con nanopartículas de quitosano.

Se cultivaron monocitos de sangre periférica durante 7 días en presencia de nanopartículas de quitosano (0.30 mg/mL) y nanopartículas de quitosano combinadas con antígeno (albumina de pollo: 1mg/mL) y hemocianina (KLH: 10 ng/mL). Control del experimento: células cultivadas con RPMI-1640 con 10% de SFB durante 7 días. Control de inhibición de fagocitosis: Células cultivadas a 4°C durante 8 horas. Las variables evaluadas se presentan como el promedio \pm la desviación estándar y la diferencia entre los grupos se evaluó realizando una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los asteriscos (*) señalan que existe diferencia significativa al compararse con el control.

9. Discusión.

La capacidad de las células para internalizar e interactuar con nanopartículas está asociada a las propiedades físico-químicas que las caracterizan. Patel y colaboradores han descrito que el tamaño de nanopartícula, su carga superficial y los grupos funcionales presentes son parámetros que definen la interacción e internalización de las nanopartículas por las células (Patel et al., 2007).

Nuestros resultados de caracterización físico-química indican que las nanopartículas de quitosano poseen un tamaño promedio de 208 nm y se distribuyen de manera unimodal con un índice de polidispersidad de 0.181. La decisión de utilizar nanopartículas de quitosano del tamaño antes mencionado está basada en las dimensiones establecidas de carga de las vesículas intracelulares que participan durante el proceso de micropinocitosis, descritas por Swanson y Watts. De este modo las nanopartículas de quitosano sintetizadas se encuentran dentro de las dimensiones reportadas de carga (>200 nm) de los micropinosomas que participan en la internalización de las nanopartículas hacia el interior celular (Swanson and Watts, 1995). Por otra parte, el índice de polidispersidad obtenido en el presente trabajo es similar al reportado por Shahrooz Saremi *et al.*, 2011, quienes han descrito que las nanopartículas que poseen índices de polidispersidad menores a 0.2 son consideradas como sistemas cuya distribución poblacional es de tamaño homogéneo.

De acuerdo a lo establecido por Jin y colaboradores, las cargas positivas en la superficie de las nanopartículas son una característica ideal para incrementar el grado de interacción entre las nanopartículas y los componentes cargados negativamente presentes en las membranas celulares mediante atracciones electrostáticas, potenciando así el proceso de internalización de componentes exógenos (Jin *et al.*, 2009). Nuestro método modificado de gelación iónica permitió obtener nanopartículas de quitosano de carácter catiónico (potencial Z: +24.7 mV). Resultados similares han sido reportados por Dongzhi Hou *et al.*, 2015, en cuyas investigaciones han reportado nanopartículas de carácter catiónico que poseen rangos de potencial Z de +24.6 mV a +36.4 mV. Lo anterior también es fundamentado en base a las observaciones realizadas por Alexis *et al.*, 2008, señalando que la tasa de internalización de las nanopartículas cargadas positivamente es muy alto tanto en líneas celulares fagocíticas como en aquellas no fagocíticas.

Con la finalidad de evaluar nuestro método de gelación iónica, se decidió a llevar a cabo estudios de microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de infrarrojo para valorar así la síntesis química de las nanopartículas de quitosano. El proceso de gelación iónica se llevó a cabo con éxito al corroborar la presencia de una banda de absorción característica de la vibración generada entre un grupo P-O mediante espectroscopia de infrarrojo. La caracterización anterior ha sido reportada por Vimal y colaboradores, cuyos experimentos han demostrado que esta banda de absorción solo se presenta en nanopartículas sintetizadas mediante gelación iónica y representa la interacción que existe entre el grupo amino del quitosano y el grupo fosfato del tripolifosfato poentasódico utilizado comúnmente durante la síntesis. Morfológicamente, nuestras nanopartículas se asemejan a las reportadas por Li-Ming Zhao, el cual las describe al microscopio electrónico de barrido como partículas de superficie lisa y de morfología esférica a semiesférica (Li-Ming Zhao *et al.*, 2011).

Tras la caracterización físico-química de las nanopartículas, se procedió a evaluar la concentración de lipopolisacárido presente en las mismas. Debido a que esta molécula es un potente inductor de diferenciación de monocitos humanos hacia células dendríticas (Kawamura Kodai *et al.*, 2005), se decidió trabajar con nanopartículas cuyas concentraciones de lipopolisacárido se encontraran dentro de los límites permisibles actualmente aceptados por la FDA para fármacos inyectables y productos sanitarios (U.S. Department of Health and Human Services, 2012). Nosotros encontramos que la concentración de endotoxina presente en las nanopartículas de quitosano resultó ser menor a 0.05 UE/mL. Esta concentración se encuentra dentro de los límites permisibles de lipopolisacárido de acuerdo a lo estipulado por el departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos comparable a instrumentos médicos que entran en contacto con componentes del sistema cardiovascular y linfático (0.5 UE/mL), dispositivos médicos que tienen contacto con fluido cerebroespinal (0.06 UE/mL), agua inyectable (0.25 UE/mL), agua esterilizada para inhalación (0.5 UE/mL), agua esterilizada para irrigación (<0.25 UE/mL) y agua esterilizada para hemodiálisis (<2UE/mL).

Actualmente las moléculas de superficie estudiadas durante el proceso de diferenciación de células dendríticas incluyen los marcadores celulares: CD80, HLA-II, CD83 y CD14. Los primeros dos son marcadores celulares requeridos durante la sinapsis inmunológica. CD80 es una molécula de tipo co-estimulador perteneciente a la familia B7 la cual se presenta durante la activación de células dendríticas maduras (Wieder, 2003) y funge como señal secundaria durante la sinapsis inmunológica (Tseng and Dustin, 2002). Por otra parte, HLA-II es una molécula involucrada en la presentación de antígenos intravesiculares o exógenos y participa como señal principal durante la sinapsis inmunológica (Vega G., 2009). Actualmente CD83 es aceptado como un marcador característico de células dendríticas maduras (Lechmann *et al.*, 2002), mientras que CD14 es un receptor fundamental durante la respuesta inmune innata el cual puede reconocer estructuras en base a patrones moleculares específicos (Arroyo-Espliguero *et al.*, 2004). En nuestro estudio, las nanopartículas de quitosano y su combinación con albumina de pollo y adyuvante fueron capaces de sobre expresar los marcadores celulares CD14, CD80, CD83 y HLA-II en monocitos humanos al cultivarse durante 7 días. Estos hallazgos concuerdan con múltiples estudios que involucran el quitosano como un biomaterial capaz de inducir diferenciación en diversos modelos celulares. Babensee y colaboradores demostraron la capacidad del quitosano para sobre expresar los marcadores celulares CD14, CD80, CD83 y HLA-II en monocitos de sangre periférica cultivados durante 5 días con GM-CSF e IL-4 (células dendríticas inmaduras) en combinación con una película de quitosano como estímulo final durante 48 horas más (Babensee and Paranjpe, 2005). En otro estudio similar, Yong-Chong Lin y colaboradores aislaron monocitos procedentes de médula ósea de ratones C57BL/6 y los cultivaron con GM-CSF e IL-4 en placas de cultivo tradicionales y en placas con películas de quitosano, encontrando que los grupos experimentales que se habían cultivado sobre películas de quitosano poseían una mayor expresión de los marcadores celulares CD14, CD80 y CD83 además de un mayor número de células no adherentes (Yong-Chong Lin *et al.*, 2014). Por último, el equipo de trabajo de Lihui Jia demostró que el quitosano en solución es capaz de sobreexpresar las moléculas CD80, CD83 y MHC-II sobre células dendríticas inmaduras procedentes de ratones hembra C57BL/c cultivadas con GM-CSF e IL-4 durante 4 horas en placas de poliestireno (Lihui Jia *et al.*, 2014).

Aunque los estudios anteriores evidencian la capacidad del quitosano para sobre expresar marcadores característicos de células dendríticas maduras en diversos tipos de células, todos estos han utilizado células en estadios inmaduros extraídas directamente de modelos animales o bien precursores celulares tratados previamente con GM-CSF e IL-4 que estimulan a las células a adquirir un fenotipo de célula dendrítica inmadura y evitar su diferenciación hacia un fenotipo de macrófago (Banchereau and Schmitt, 1995).

El proceso de diferenciación de células dendríticas con citocinas recombinantes actualmente aceptado involucra la pérdida de la molécula CD14, un marcador celular de linaje monocítico el cual debe de presentarse en bajos porcentajes en células dendríticas maduras (Wieder, 2003). A pesar de que esta molécula resultó expresarse en altos porcentajes en la presente investigación así como en otros reportes (Babensee and Paranjpe, 2005. Yong-Chong Lin *et al.*, 2014), su alta expresión quizá se explique debido a que esta molécula en conjunto con su correceptor (TLR-4) son capaces de reconocer el patrón molecular característico del quitosano de acuerdo a Villers C. *et al.*, 2009, e inducir vías de señalización intracelulares que desembocan con la activación de factores de transcripción entre ellos NF- κ B, los cuales son capaces de inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, GM-CSF) y receptores celulares entre ellos el marcador celular CD14 (Arroyo-Espliguero R. *et al.*, 2004). Los mediadores celulares secretados propiciarían un ambiente proinflamatorio requerido durante la fase de diferenciación celular y representarían un estímulo de tipo autócrino-parácrino que permitirá mantener un equilibrio entre el número de mediadores proinflamatorios secretados y el número de receptores sintetizados por las células (Pollara G. *et al.*, 2006).

La morfología de las células dendríticas es una característica clave para su caracterización. De acuerdo a Wieder, la característica morfológica principal de las células dendríticas es la presencia de prolongaciones que se extienden desde el centro de la célula las cuales pueden tomar la forma de dendritas (similares a las neuronas), pseudópodos o vellos los cuales aumentan el grado de captación de antígenos del microambiente que se encuentran circundando (Wieder *et al.*, 2003). Nuestros análisis morfológicos confirman la presencia de prolongaciones citoplasmáticas en las células tratadas con nanopartículas de quitosano. A pesar de que las células tratadas mostraron prolongaciones celulares, estas no son del

todo abundantes como las reportadas por Olguin *et al.*, 2012. Lo anterior podría evidenciar la baja capacidad de las nanopartículas de quitosano para inducir cambios morfológicos a diferencia de las citocinas recombinantes utilizadas en los protocolos actualmente establecidos.

La capacidad para captar antígenos del microambiente es una de las principales funciones de las células dendríticas. Esta habilidad les permite procesar los antígenos y presentarlos hacia células del sistema inmune adaptativo para así levantar respuestas inmunes específicas. El ensayo de FITC-dextran permitió corroborar que las células tratadas con nanopartículas de quitosano y las mismas en combinación con antígeno y adyuvante poseen la capacidad para realizar el proceso de fagocitosis y captar antígenos solubles *in vitro*, lo anterior concuerda con trabajos reportados por Bürdek en donde este ensayo es utilizado para evaluar esta característica en células dendríticas (Bürdek *et al.*, 2010).

Los hallazgos en el presente trabajo son de gran importancia debido a que representan el primer reporte del efecto del quitosano a escala nanométrica sobre la diferenciación de monocitos humanos hacia un fenotipo de célula dendrítica sin hacer uso de citocinas recombinantes durante el proceso de diferenciación celular. De esta manera se abre un nuevo panorama de investigación de estas nanopartículas como agentes de diferenciación celular que puedan ser incorporadas en un futuro a los protocolos actuales de generación de células dendríticas.

10. Conclusiones.

- Se estandarizó un método modificado de gelación iónica el cual permite obtener nanopartículas de quitosano de 208 nm de tamaño promedio, las cuales son estables en suspensión y poseen una concentración de endotoxina dentro de los límites permisibles establecidos por el departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos.
- Los tratamientos con nanopartículas de quitosano o nanopartículas de quitosano combinado con albumina de pollo y hemocianina son capaces de inducir la expresión de marcadores celulares involucrados en la sinapsis inmunológica y coestimulación celular (CD80), moléculas de superficie características de células dendríticas maduras (CD83), moléculas involucradas en la presentación antigénica (HLA II) y moléculas involucradas en la fijación del quitosano (CD14) en monocitos humanos.
- No se encontró que los tratamientos con nanopartículas de quitosano o nanopartículas de quitosano combinado con albumina de pollo y hemocianina afectaran la viabilidad celular al compararse entre ellos, sin embargo al compararlos con el control se encontró que el tratamiento con nanopartículas de quitosano en combinación con albumina de pollo y hemocianina afecta de manera significativa la viabilidad celular.
- Los tratamientos con nanopartículas de quitosano o nanopartículas de quitosano combinado con albumina de pollo y hemocianina fueron capaces de inducir cambios morfológicos, la adquisición de proyección citoplasmáticas celulares de aspecto irregular y pseudópodos en monocitos humanos.
- Las células tratadas con nanopartículas de quitosano o nanopartículas de quitosano combinado con albumina de pollo y hemocianina poseen la capacidad de incrementar el proceso de fagocitosis con respecto a el control. Las células tratadas solamente con nanopartículas de quitosano poseen una capacidad fagocítica mayor de manera significativa al compararse con el tratamiento combinado y el control.

11. Perspectivas.

- Estudiar el efecto combinado de nanopartículas de quitosano con citocinas recombinantes (IL-4, GM-CSF, IL-6, TNF- α , PGE₂, IL-1 β) durante el proceso de diferenciación celular de monocitos humanos hacia células dendríticas.
- Incorporación de nanopartículas de quitosano a los protocolos actuales de generación de células dendríticas y disminuir los costos que involucra el proceso de diferenciación celular.
- Evaluar la capacidad anti-tumoral de linfocitos T CD8⁺ activados por células dendríticas maduras *in vitro* con nanopartículas de quitosano en un modelo murino.

12. Literatura consultada

- 1- Abbas K. , Lichtman H., Pillas S. 2008. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier, pp. 137-149.
- 2- Abhilash. 2010. Potential Applications of Nanoparticles. *Int J. Pharm. Bio Sci* 1.
- 3- Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharmaceut* 5:505–515.
- 4- Allavena P., Piemonti L., Longoni D., Bernasconi., Stoppacciaro A., Ruco L. Mantovani A. 1998. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*, 28:359-369.
- 5- Anassi Enock, Anadu Uche. 2011. Sipuleucel-T (Provenge) Injection. The first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *Drug Forecast*. 36:197-201.
- 6- Arroyo-Espliguero. Avanzas P. Jeffery S. Kaski JC. 2004. CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events?. Available on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1768457/pdf/hrt09000983.pdf>
- 7- Babensee E., Paranjpe Abhijit. 2005. Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products. *Journal of Biomedical Materials Research*, 74:503-510.
- 8- Banchereau J. Schmitt D. 2012. *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology*. Springer Science and Business Media. 378:50-51.
- 9- Begoña M, Vazquez, Sureda M, Rebollo J. 2012. Células dendríticas I: aspectos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1):21-30.
- 10- Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. 2002. A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science*, 297:2060-2063.
- 11- Bromley SK, laboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, Weiss A, Dustin ML. 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol*, 2:1159-1166.
- 12- Burdek M. Spranger S. Wilde S. Frankenberger B. Schendel D. Geiger C. 2010. Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. *Journal of Translational Medicine*. 8:90.

- 13- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63: 125-132.
- 14- Cella M., Salio M., Sakakibara Y., Langen H., Julkunen I. Lanzavecchia A. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*, 189:821-829.
- 15- Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. 2001. CTLA-4 mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*, 19:565-594.
- 16- Chithrani BD, Chan WCW. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett* 7:1542–1550.
- 17- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticles uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6:662-668.
- 18- Chung NP, Chen Y, Chan VS. Tam PK, Lin CL. 2004. Dendritic cells: sentinels against pathogens. *Histol Histopathol*, 19:317-324.
- 19- Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.
- 20- Cosson P, Soldati T. 2008. Eat, kill or die: When amoeba meets bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 11:271–276.
- 21- Dendreon Corporation. 2014. Provenge (Sipuleucel-T) Highlights of prescribing information. Food and Drug Administration. P-A-05.10-032.02, TRN-80011.03, LBS-76022.03. Available on <http://www.dendreon.com/prescribing-information.pdf>
- 22- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 5:1365-1369.
- 23- Dongzhi Hou¹, Ruyi Gui¹, Sheng Hu¹, Yi Huang, Zuyong Feng, Qineng Ping. 2015. Preparation and Characterization of Novel Drug-Inserted-Montmorillonite Chitosan Carriers for Ocular Drug Delivery. *Advances in Nanoparticles.* 4:70-84.

- 24- Elson Santiago de Alvarenga (2011). Characterization and Properties of Chitosan, Biotechnology of Biopolymers, Prof. Magdy Elnashar (Ed.), ISBN: 978-953-307-179-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/biotechnology-of-biopolymers/characterization-and-properties-of-chitosan>
- 25- Felzmann T, Witt V, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, Paul P. 2003. Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection cytotherapy, 5:39-398.
- 26- Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. Science, 251:313-316..
- 27- Gao H, Shi W, freund LB, 2005. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. Proc Natl Acad Sci USA. 102:9469-9474.
- 28- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW. Russell DW, Schneider WJ. 1985. Receptor- mediated endocytosis: Concepts emerging from receptor system. Ann Rev Cell Biol. 1:1-39.
- 29- Goycoolea F. M., C. López-Remuñán, Alonso M.J. 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En: (Vila Jato, J. L. ed.) Nanotecnología Farmacéutica. Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España, pp 103-131.
- 30- Goycoolea F.M., Remuñán-lópez, Alonso M.J. 2009. Nanopartículas a base de polisacárido quitosano. Nanotecnología farmaceutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pag. 103-131.
- 31- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science 1999, 285:221-227
- 32- Granilli-Piperno A., Pope M., Inaba K., Steinman R.. 1995. Coexpression of NF-Kb/Rel and SpI transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia. Proc Natl Acad Sci, 92:10944-10948.
- 33- Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature 1997;389:737-742.

- 34- Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing. U.S. Department of Health and Human Services, 2012.
- 35- Hart DN, Prickett TC.1993.Adhesion molecules in tonsil DC-T cell interactions. *Adv Ex Med Biol*, 329:65.69.
- 36- Hart DN. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90:3245-3287.
- 37- He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31:3657–3666
- 38- Hirota K, Terada H. 2012. Endocytosis of particle formulations by macrophages and its application to clinical treatment. In Ceresa B, ed, *Molecular Regulation of Endocytosis*. InTech, Rijeka, Croatia
- 39- Holdorf AD, Lee KH, Burack, WR, Allen PM and Shaw AS. 2002. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol*, 3:259-264.
- 40- Holzapfel V, Lorenz M, Weiss CK, Schrezenmeier H, Landfester K, Mailänder V. 2006. Synthesis and biomedical applications of functionalized fluorescent and magnetic dual reporter nanoparticles as obtained in the miniemulsion process. *J Phys Condensed Matter*18:2581–2594.
- 41- Jin H, Heller DA, Sharma R, Strano MS. 2009. Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: Single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *Am Chem Soc Nano* 3:149–158.
- 42- Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T. 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 170:1249-1256.
- 43- Kantoff W. Higano S. Shore N. Berger R. Small J. Penson F. Redfern H. Ferrari C. Dreicer R. Sims B. Xu Yi. Frohlich W. Schellhammer F. 2010. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N ENGL J MED*. 363;5.
- 44- Katja Kettler, Karin Veltman, Dik vann de Meent, Annemarie van Wezel. 2014. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental

- conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 33, No. 3, pp 481-492.
- 45- Kim, B.G. & Kang, I.J. 2006. Chitosan nanoparticles for the effective vaccine delivery system. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech. Technical Proceedings. 2: 388-391.
 - 46- Kim, B.G. & Kang, I.J. 2006. Chitosan nanoparticles for the effective vaccine delivery system. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech. Technical Proceedings. 2: 388-391.
 - 47- Kodai Kawamura, Kazuhiro Iyonaga, Hidenori Ichiyasu, Junji Nagano, Moritaka Suga, and Yutaka Sasaki. 2005. Differentiation, Maturation, and Survival of Dendritic Cells by Osteopontin Regulation. *Clin Vaccine Immunol.* 12:206-212.
 - 48- Lead JR. 2009. *Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology*. Wiley-Blackwell, Chippenham, UK
 - 49- Lechmann M. Berchtold S. Hauber J. Steinkasserer A. 2002. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* 23:273-275.
 - 50- Lihui Jia, Xinghua Gao, Yiqing Wang, Na Yao, Xiaodong Zhang. 2014. Structural, phenotypic and functional maturation of bone marrow dendritic cells (BMDCs) induced by Chitosan (CTS). *Biologicals* 30:1-5.
 - 51- Li-Ming Zhao, Lu-E Shi, Zhi-Liang Zhang, Jian-Min Chen, Dong-Dong Shi, Jie Yang and Zhen-Xing Tang. 2011. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 28:353-362.
 - 52- Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. 1989. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by surface mediated T cell activation pathway. *Science*, 244:339-349.
 - 53- López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Bastos-González, D. 2005. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interf. Sci.* 283: 344-351.
 - 54- López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Bastos-González, D. 2005. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interf. Sci.* 283: 344-351.

- 55- Lorenz MR, Holzapfel V, Musyanovych A, Nothelfer K, Walther P, Frank H, Landfester K, Schrezenmeier H, Mailänder V. 2006. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials* 27:2820–2828.
- 56- Majeti N.V., Ravi Kumar, 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46:1-27.
- 57- Marguerite Rinaudo. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31:603-632.
- 58- Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, Chandler Cintia, Gutiérrez Edixon. 2011. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revision de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU.* 1:53-58.
- 59- McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/ Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 2002;23: 450-455.
- 60- McLellan AD, Starling GC, Williams LA. Hock BD, Hart DN. 1995. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol*, 25:2064-3525.
- 61- McNeil E. 2005. Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology.* 78:585-594.
- 62- Mercer J, Helenius A. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol.* 11:510-520.
- 63- Miranda C. and Lizárraga P. 2012. Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application. Available on <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/is-chitosan-a-new-panacea-areas-of-application>
- 64- Mofazzal Jahromi M. A., Karimi Mahdi, Azadmanesh Keyhan, Manesh Naderi Hossein, Mohammad Hassan Zuhair, Mohammad Moazzeni Seyed. 2013. The effect of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles on maturation and function of dendritic cells. *Comp Clin Pathol*, 23:1421-1427.
- 65- Murillo M., Espuelas S., Prior S., Vitas A., Renedo J., Goñi M., Irache J., Gamazo C. 2001. Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. *Rev Med Univ Navarra* Vol 45, No. 4, 19-34.

- 66- Nagavarma B.V.N., Hemant K.S.YADV, Ayaza, Vasudha L.S, Shivakumar H.G. 2012. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-A review. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 5:16-23.
- 67- Nagavarma B.V.N., Hemant K.S.YADV, Ayaza, Vasudha L.S, Shivakumar H.G. 2012. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-A review. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 5:16-23
- 68- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. Science, 307:254-258.
- 69- Ogata M., Zhang Y., Wang., Itakura M., Zhang Y., Harada A., Hashimoto S. and Matsushima K. 1999. Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor beta 1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. Blood, 93: 3225-3232.
- 70- Olguín Contreras. 2012. Actividad citotóxica de linfocitos T CD8⁺ estimulados con interleucina 15 y 21 contra la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 *in vitro*. Disponible en <http://eprints.uanl.mx/3112/1/1080227470.pdf>
- 71- Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson P, Carballido J, Picker L, Lund-Johansen F.1997. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. Proc. Natl. Acad. Sci, 94:12551-12556.
- 72- Oyama T., Ran S., Ishida T., Nadaf S., Kerr L., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. J Immunol, 160:1224-1232.
- 73- Park Jaehyung, Babensee E. 2012. Differential functional effects of biomaterials on dendritic cell maturation. Acta Biomaterialia, 8:3606-3617.
- 74- Parris Kidd. 2003. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. Altern Med Rev, 3:223-246.
- 75- Patel LN, Zaro JL, Shen W-C. 2007. Cell penetrating peptides: Intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. Pharmaceut Res 24:1997-1992.
- 76- Pollara G. Handley M. Kwan A. Chain B. Katz D. 2006. Autocrine Type I Interferon Amplifies Dendritic Cell Responses to Lipopolysaccharide Via the

- Nuclear Factor κ B/p38 Pathway. *Scandinavian Journal of Immunology*. 63:151-154.
- 77- Poranen MM, Daugelavičius R, Bamford DH. 2009. Common principles in viral entry. *Annu Rev Microbiol* 56:521–538
- 78- Prabu and Natarajan. 2012. Bioprospecting of shells of crustaceans. *Int J Pharm Sci*, Vol, Suppl 4, 1-3.
- 79- R&D Systems. 2002. Dendritic Cell Maturation. R&D Systems' 2002 catalog.
- 80- Ramirez L.Plascencia M. Huerta S. Vázquez H. Shirai K. 2002. Obtención y caracterización de quitinas parcialmente desacetiladas mediante tratamiento biológico-químico.VIII Simposio Latinoamericano de polímeros. Libro de resúmenes. 593-594.
- 81- Ramírez Miguel Á, Rodríguez Aida T, Alfonso Luis, Peniche Carlos. 2010. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada* v.27 n. 4; 270-276.
- 82- Ramkumar Ponnuraj, Janakiraman K, Sivaraman Gopalakrishnan, Senthilnathan K, Meganathan V, Saravanan P. 2015. Formulation and characterization of epigallocatechin gallate nanoparticles. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 5: 387-399.
- 83- Randolph G, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman R, Muller W. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*, 282:480-483.
- 84- Rejane C. and Douglas de Britto. 2009. A review of the antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciencia y Tecnología*. 19:241-247.
- 85- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 337:159-169.
- 86- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M. Rotta G, Bonasio R. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001;2:361-367.

- 87-Romani N., Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch P, Steinman R, Schuler G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 180:83-93.
- 88-Rus H, Cudrici C, Niculescu F. 2005. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* 33:103–112.
- 89-Sallusto F. Cella M. Danieli C. Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 182:389-400.
- 90-Sastoque Cala L., Mercado Reyes M., Martínez Salgado, M., Quevedo Hidalgo, B., Pedroza Rodríguez, A. Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 6 N° 2 (2007) 137-146
- 91-Schmid G. 2004. Nanoparticles: from theory to applications Weinheim Germany: Wiley-VCH Publishers.
- 92-Schoenberger SP, Toes RE, Van der Voort El. Offringa R. Melief CJ. 1998. T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393:480-483.
- 93-Shahrooz Saremi, Fatemeh Atyabi, Seyedeh Parinaz Akhlaghi, Seyed Nasser Ostad and Rassoul Dinarvand. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:119–128.
- 94-Sheikh N.A., Jones L.A. 2008. CD54 is a surrogate marker of antigen presenting cell activation. *Cancer Immunol. Immunother.* 57:1381–1390.
- 95-Singh R, Lillard J Jr. 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*, 86:215-223.
- 96-Smith AE, Helenius A. 2009. How viruses enter animal cells. *Science* 304:237–242.
- 97-Steinmann RM, Adams JC, Cohn ZA. 1975. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med.*, 141:804-820.

- 98- Steinmann RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. 1979. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med.*, 149:1-16.
- 99- Swallow MM, Wallin JJ and Sha WC. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity*, 11:423-432.
- 100- Swanson JA, Watts C: Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* 1995,5(11):424–428.
- 101- Takamizawa M, Rivas A, Fagnoni F, Benike C, Kosek J, Hyakawa H. 1997. Dendritic cells that process and present nominal antigens to naïve T lymphocytes are derived from CD2⁺ precursors. *J Immunol*, 158:2134-2142 Fagnoni FF, Takamizawa M, Godfrey WR, Rivas A, Azuma M, Okumura K. 1995. Role of B70/B7-2 in CD4⁺ T-cell immune responses induced by dendritic cells. *Immunology*. *Immunology*, 85:467-474.
- 102- Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH. 1989. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:1333-1337.
- 103- Tseng S., Dustin L. 2002. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Current Opinion in Cell Biology*, 14:575-580.
- 104- Turley Sj, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, Mellman I. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, 288:522-527.
- 105- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1987. Food and Drug Administration Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices.
- 106- Vega Robledo G. 2009. Complejo mayor de histocompatibilidad. *Rev Fac Med UNAM*. 52:86-89.
- 107- Verdijk R., Mutis T., Esendam B., Kamp J., Melief C., Brand A., Goulmy E. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol*, 163:57-61.

- 108- Villiers C. Chevallet M. Couderc R. Freitas Heidi. Dorsselaer A. Marche P. Rabilloud T. 2009. Chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR-4 dependent mechanism. *Molecular and Cellular Proteomics*. 8:1252-1264.
- 109- Vimal S. CH/TPPnanoparticles: Preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. 2013. *Act trop*. 3139 1-8.
- 110- Waterhouse P, Merengere LE, Mittrucker HW, Mak TW. 1996. CTLA-4 a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev*, 153:183-207.
- 111- Wieder E.. 2003. Dendritic cells: A basic review. *International Society for cellular Therapy*.
- 112- Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G., Adorini L., Zimmermann V., Davoust J., Ricciardi-Castagnoli P. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor dependent long-term cultures. *J Exp Med*, 185:317-328.
- 113- Wulfig C, Davis MM. 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science*, 282:2266-2269.
- 114- Xiaomei Wang, Chi Na, Tang Xing. 2008. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70:735–740.
- 115- Xiaomei Wang, Na Chi, Xing Tang. 2008. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70:735-740.
- 116- Yong-Chong Lin, Pei Jen Lou, Tai-Horng Young. 2014. Chitosan as an adjuvant-like substrate for dendritic cell culture to enhance antitumor effects. *Biomaterials*, 35:8867-8875.
- 117- Zhao C-M, Wang W-X. 2012. Size-dependent uptake of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 46:11345– 11351.
- 118- Zhou L. Tedder T. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol*, 154:3821-3835.

13. Resumen biográfico

Edgar López Pacheco

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Título de tesis:

POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO COMO INDUCTOR DE
DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A CELULAS DENDRÍTICAS.

Campo de estudio: Nanotecnología e Inmunología.

Datos personales: Nacido en Monterrey Nuevo León, México, el 24 de Diciembre de 1990.
Hijo de María del Refugio Pacheco Mendoza y Jesús López Urdiales..

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de
Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2013. Primer lugar de la generación 2009-2013.
Tesis de licenciatura titulada: Efecto de la IL-2 y ciclosporina sobre los niveles de
expresión de FOXP3 y CD25 en la línea celular B16F10 de melanoma murino.

Experiencia profesional: Laboratorista clínico y responsable de sanidad y calidad
alimentaria.